



Universidad de Córdoba
Departamento de Química Analítica

**SISTEMAS SUPRAMOLECULARES EN
LA DETERMINACIÓN DE DROGAS
TERAPÉUTICAS: NUEVOS MÉTODOS
DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN**

TESIS DOCTORAL
Esther M^a Costi López
Córdoba, Julio de 2010

TITULO: *Sistemas supramoleculares en la determinación de drogas terapéuticas: nuevos métodos de extracción y cuantificación*

AUTOR: *Esther María Costi López*

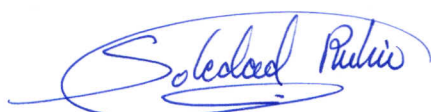
© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2010
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

ISBN-13: 978-84-693-4184-1

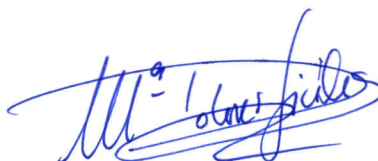
SISTEMAS SUPRAMOLECULARES EN LA DETERMINACIÓN DE DROGAS TERAPÉUTICAS: NUEVOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

LAS DIRECTORAS,



Fdo. S. Rubio Bravo

Catedrática del Departamento
de Química Analítica de la
Universidad de Córdoba

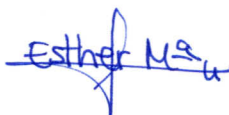


Fdo. M.D. Sicilia Criado

Profesora Titular del Departamento
de Química Analítica de la
Universidad de Córdoba

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas

LA DOCTORANDA,



Fdo.: Esther M^a Costi López

Licenciada en Ciencias Químicas

TÍTULO DE LA TESIS:

SISTEMAS SUPRAMOLECULARES EN LA DETERMINACIÓN DE DROGAS TERAPÉUTICAS: NUEVOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

DOCTORANDO/A: ESTHER MARÍA COSTI LÓPEZ

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Esta Tesis Doctoral supone un importante avance en el ámbito de la Química Analítica Supramolecular. Las investigaciones realizadas han demostrado que sistemas supramoleculares de diferente naturaleza (agregados en disolución, adsorbentes y disolventes) tienen la capacidad de interactuar fuertemente con moléculas de drogas terapéuticas y que sobre esta base es posible desarrollar metodologías analíticas para la determinación de este tipo de compuestos en diferentes ámbitos de aplicación: control de la calidad de fármacos, control de la calidad de alimentos y monitorización de la contaminación ambiental. Como resultado de las investigaciones realizadas, que se han desarrollado de acuerdo con lo previsto en el Proyecto de Tesis Doctoral presentado, se han propuesto diferentes métodos que presentan excelentes prestaciones analíticas y probada aplicabilidad para la determinación de principios activos con muy diferente estructura molecular: antibióticos del grupo de los fusidanos, quinolonas y sulfonamidas, antiinflamatorios no esteroideos y tensioactivos catiónicos usados como antisépticos y contraceptivos, en una amplia variedad de muestras: fármacos, alimentos de origen animal y muestras acuosas medioambientales. Los resultados más relevantes de las investigaciones realizadas se han publicado en prestigiosas revistas internacionales especializadas (situadas en el primer cuartil de la categoría de Química Analítica en el Journal Citation Report, JCR), con un total de 4 artículos publicados y 1 artículo enviado para su publicación, y se han presentado en congresos nacionales e internacionales de primer orden (8 comunicaciones).

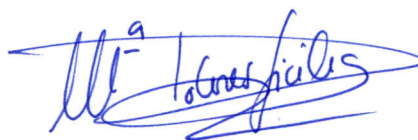
La Doctoranda ha obtenido el Diploma de Estudios Avanzados dentro del Programa de Doctorado de Química Fina, con mención de calidad, que se imparte en la Universidad de Córdoba, obteniendo la máxima calificación en los cursos de Doctorado y en el trabajo correspondiente al periodo de investigación.

Teniendo en cuenta la originalidad y extensión del trabajo de investigación realizado y la formación adquirida por la Doctoranda durante la realización de esta Tesis Doctoral, las directoras de este trabajo autorizan su presentación.

Córdoba, 16 de junio de 2010



Soledad Rubio Bravo



María Dolores Sicilia Criado

Agradezco a la Junta de Andalucía, la concesión de la beca de Formación de Personal Docente Investigador en las Universidades Andaluzas, que me ha posibilitado la dedicación a esta Tesis Doctoral durante cuatro años.

En la vida, sólo se puede lograr algo gracias al apoyo, confianza y esfuerzo de quienes creen en ti y a las motivaciones de la vida misma, por ello, en estas líneas agradezco a todas las personas que de alguna manera me han ayudado en esta etapa.

Mi más sincero agradecimiento...

A mis directoras de Tesis Sole y Mariló, y también a Loreto, por sus enseñanzas, disponibilidad y apoyo durante la realización de este trabajo, así como por saber transmitirme vuestro entusiasmo por la investigación.

A todos mis compañeros de grupo por la ayuda prestada en la consecución de este trabajo, por las conversaciones y risas en el laboratorio, y por los buenos y malos momentos compartidos que hacen inolvidable esta etapa de mi vida.

A Conchita, Juani y Diego por su ayuda, disposición y amabilidad.

MIL GRACIAS A TODOS

A mi familia, especialmente a mis padres, por su confianza, comprensión y generosidad mostrada a lo largo de todos estos años. Gracias por haberme dado la oportunidad que vosotros no tuvisteis y apoyarme en los momentos más duros.

A Dani, por su infinito aguante, su comprensión,
su cariño y tantas otras cosas que no se pueden
expresar con palabras.

A David, mi futuro bebé.

“Si he conseguido ver más lejos es porque me he aupado en hombros de gigantes”.

Isaac Newton

“Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto, y pensar lo que nadie más ha pensado”.

Albert Szent-Györgi



ÍNDICE

ÍNDICE

Objeto	1
Contenido	7
Introducción	13
1. Drogas terapéuticas	15
1.1. Aspectos generales	15
1.1.1. Definiciones y clasificación	15
1.1.2. Control de calidad de fármacos	17
1.1.3. Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal	17
1.1.4. Fuentes y efectos de las drogas terapéuticas en el medioambiente	21
1.2. Drogas terapéuticas investigadas	24
1.2.1. Propiedades físico-químicas	24
1.2.2. Actividad farmacológica	29
1.2.3. Residuos de antibióticos en los productos alimenticios de origen animal	31
1.2.4. Drogas antiinflamatorias no esteroideas en el medioambiente	31
2. Sistemas supramoleculares en Química Analítica	33
2.1. Conceptos generales	33
2.2. Clasificación	34
2.3. Interacciones sistema supramolecular-sistema químico	36
2.4. Desarrollos en Química Analítica basados en el uso de sistemas supramoleculares	39
3. Sistemas supramoleculares mixtos de drogas y tensioactivos	45
3.1. Autoensamblaje de drogas: comportamiento en disolución	45
3.2. Agregados mixtos de drogas y tensioactivos: comportamiento y estructuras	46
4. Bibliografía	50

Parte I. Método de grado de enlace tensioactivo-colorante	57
1. Objeto	59
2. Metodología de grado de enlace tensioactivo-colorante	60
2.1. Fundamento teórico	60
2.2. Procedimiento operacional	61
2.3. Sistema químico tensioactivo-colorante	62
2.4. Determinación no específica de tensioactivos	64
2.5. Determinación de drogas terapéuticas	66
2.5.1. Determinación de drogas anfifílicas aniónicas y no iónicas	66
2.5.2. Determinación de drogas hidrotópicas	67
2.6. Determinación de aditivos alimentarios	69
3. Bibliografía	71
Capítulo 1. Quantitation of fusidane antibiotics in pharmaceuticals using the surfactant-dye binding degree method	73
Capítulo 2. Determination of cationic surfactants in pharmaceuticals based on competitive aggregation in ternary amphiphile mixtures	91
Parte II. Extracción basada en el uso de disolventes supramoleculares	111
1. Objeto	113
2. Disolventes supramoleculares	114
2.1. Formación del disolvente supramolecular. Fenómeno de coacervación	114
2.2. Tipos de disolventes supramoleculares	115
2.2.1. Disolventes de micelas de tensioactivos no iónicos	116
2.2.2. Disolventes de micelas de tensioactivos anfóteros	118
2.2.3. Disolventes de micelas de tensioactivos catiónicos	118
2.2.4. Disolventes de micelas de tensioactivos aniónicos	119
2.2.5. Disolventes de micelas mixtas	120
2.2.6. Disolventes de micelas inversas de ácidos alquilcarboxílicos	121

2.2.7. Disolventes de vesículas de ácidos alquilcarboxílicos	122
2.3. Propiedades de los disolventes supramoleculares	123
2.3.1. Capacidad de solubilización y concentración	123
2.3.2. Compatibilidad con técnicas de separación y de detección	126
2.3.3. Otras propiedades de los disolventes supramoleculares	130
2.4. Aplicaciones de los disolventes supramoleculares en extracciones analíticas	130
3. Bibliografía	135
Capítulo 3. Supramolecular solvents in solid sample microextractions: Application to the determination of residues of oxolinic acid and flumequine in fish and shellfish	139
Capítulo 4. Multiresidue analysis of sulfonamides in meat by supramolecular solvent microextraction, liquid chromatography and fluorescence detection and method validation according to the European Union 2002/657/EC directive	165
Parte III. Hemimicelas/admicelas	195
1. Objeto	197
2. Extracción en fase sólida supramolecular	198
2.1. Formación del adsorbente supramolecular	198
2.2. Proceso de adsolubilización	201
2.3. Adsolubilización de tensioactivos mediante la formación de hemimicelas/admicelas mixtas	202
2.4. Procedimiento operacional para la extracción en fase sólida supramolecular	204
2.5. Aplicaciones analíticas de la extracción en fase sólida supramolecular	205
3. Bibliografía	209
Capítulo 5. Supramolecular solid-phase extraction of ibuprofen and naproxen from sewage based on the formation of mixed supramolecular aggregates prior to their liquid chromatographic/photometric detection	211

Resumen y discusión de los resultados	235
1. Problemas analíticos abordados: Muestras y Analitos	237
2. Metodologías basadas en la medida de parámetros de agregación para la determinación de drogas terapéuticas en fármacos	238
2.1. Mecanismo de actuación de los analitos	238
2.2. Factores que afectan a la sensibilidad del método	242
2.3. Factores que afectan a la precisión del método	246
2.4. Aplicabilidad al control de calidad de fármacos	247
3. Sistemas supramoleculares para la extracción/preconcentración de residuos de drogas terapéuticas en alimentos y medioambiente	250
3.1. Determinación de residuos de drogas de uso veterinario en alimentos mediante extracción en un disolvente supramolecular y cuantificación mediante CL/FL	251
3.1.1. Muestras	251
3.1.2. Extracción	253
3.1.3. Cuantificación	256
3.2. Determinación de drogas terapéuticas en muestras acuosas medioambientales mediante extracción en fase sólida supramolecular y cuantificación mediante CL/FL	263
3.2.1. Adsorbente	264
3.2.2. Muestras	266
3.2.3. Extracción	267
3.2.4. Cuantificación	271
4. Bibliografía	273
Conclusiones	275
Apéndices	283
Apéndice A. Publicaciones científicas derivadas de la Tesis Doctoral	285
Apéndice B. Comunicaciones a congresos	287



OBJETO

El consumo de drogas terapéuticas está creciendo en todo el mundo de forma espectacular, de manera que se prevé que el valor del mercado mundial de productos farmacéuticos se duplique en los próximos trece años alcanzando un valor próximo al billón de euros. Las principales razones de este crecimiento las encontramos en el aumento de la población, su envejecimiento en los países desarrollados y el crecimiento de economías emergentes como la china. El extendido uso de las drogas terapéuticas, utilizadas no sólo para el tratamiento de enfermedades humanas y animales, sino también para mejorar el rendimiento de explotaciones ganaderas y piscifactorías, ha tenido como resultado un importante grado de contaminación ambiental por este tipo de compuestos. Esta panorámica hace, hoy más que nunca, fundamental el desarrollo de métodos analíticos adecuados para la determinación de drogas terapéuticas en diferentes ámbitos de aplicación: control de la calidad de los productos farmacéuticos, monitorización de la contaminación ambiental y control de la calidad de alimentos.

El control de productos farmacéuticos supone realizar un elevado número de análisis en el menor tiempo posible y con un bajo coste proporcionando resultados exactos y precisos. El análisis de muestras medioambientales y de alimentos implica el uso de sistemas de extracción previa a la detección de la droga con el fin de preconcentrar los analitos y/o eliminar interferencias de las muestras.

El objetivo general de las investigaciones que se presentan en esta Memoria ha sido el desarrollo de nuevos métodos analíticos de determinación y extracción de drogas terapéuticas basados en el uso de sistemas supramoleculares. La mayoría de estas drogas son compuestos anfífilos, es decir poseen grupos hidrófobos e hidrófilos, lo que facilita su penetración en las células y favorece su interacción con los receptores biológicos. El carácter anfílico de estas drogas les confiere características similares a las de los tensioactivos, entre las que cabe destacar su capacidad para formar agregados supramoleculares. Con esta premisa, los objetivos específicos de los trabajos de investigación realizados han sido:

1) Desarrollar nuevos métodos para la determinación de drogas en productos farmacéuticos basados en la metodología de grado de enlace tensioactivo-colorante. El fundamento de esta metodología es la competencia que se establece entre un colorante y el analito para formar agregados mixtos con un tensioactivo usado como reactivo.

2) Evaluar la capacidad de los disolventes supramoleculares para extraer residuos de drogas de uso veterinario de productos de consumo de origen animal y de los adsorbentes supramoleculares para la extracción en fase sólida de drogas terapéuticas de muestras acuosas medioambientales, previa a su determinación cromatográfica. El carácter anfífilico de las drogas hace prever que se produzcan fuertes interacciones con los tensioactivos que constituyen los sistemas supramoleculares extractantes, posibilitando una eficaz extracción/preconcentración de las mismas.

Paralelamente, la formación de la doctoranda mediante el desarrollo de actividades complementarias a la labor investigadora como la publicación de artículos científicos y la asistencia y presentación de comunicaciones a congresos, constituye un objetivo fundamental en el desarrollo de esta Tesis.



CONTENIDO

El contenido de la Memoria de esta Tesis Doctoral se ha estructurado en tres partes, precedidas de una Introducción en la que se incluyen aspectos generales de los compuestos usados como principios activos en fármacos y se justifica el interés del control de: la calidad de productos farmacéuticos, el contenido de residuos de drogas de uso veterinario en alimentos de origen animal y la contaminación medioambiental debida a las drogas terapéuticas, incidiendo especialmente en las drogas investigadas en esta Tesis. En esta Introducción, también se exponen aspectos de los sistemas supramoleculares fundamentales para los estudios desarrollados, mostrando una panorámica general del uso de estos sistemas en Química Analítica.

Los contenidos de las tres partes en las que se ha dividido esta Memoria son los siguientes:

PARTE I: Metodologías basadas en la medida de parámetros de agregación para la determinación de drogas terapéuticas en fármacos. En primer lugar se expone el fundamento y el procedimiento experimental para la implementación del método de grado de enlace tensioactivo-colorante, método que se encuadra dentro de las metodologías basadas en la medida de parámetros de agregación, además de discutir los principales resultados obtenidos en investigaciones previas sobre este método. A continuación se presentan las investigaciones realizadas sobre la metodología de grado de enlace tensioactivo-colorante en esta Tesis Doctoral, que han permitido extender la metodología a la determinación de drogas con estructuras químicas no investigadas hasta el momento, concretamente principios activos con estructuras esteroidales: antibióticos del grupo de los fusidanos (ácido fusídico y fusidato sódico) y con grupos hidrófilos catiónicos: tensioactivos catiónicos usados como antisépticos (cloruro de dodecilbenzalconio, cloruro de cetalconio, cloruro de bencetonio, cloruro de metilbencetonio, bromuro de cetrimonio, cetrimida, cloruro de cetilpiridinio y cloruro de benzalconio) y contraceptivos (cloruro de benzalconio). Los nuevos métodos analíticos desarrollados se han aplicado a la determinación de los principios activos estudiados en diferentes tipos de fármacos: pomadas, cremas, polvos, soluciones líquidas y comprimidos.

PARTE II: Extracción de residuos de drogas de uso veterinario en alimentos de origen animal basada en el uso de disolventes supramoleculares. En esta parte de la Memoria se incluye una panorámica general de los diferentes tipos de disolventes supramoleculares usados en extracciones analíticas, comparando sus prestaciones para

su uso en esquemas de extracción, para a continuación presentar los dos nuevos métodos desarrollados para la extracción de residuos de antibióticos en productos de origen animal. En ambos métodos se utiliza una nueva metodología propuesta por primera vez en esta Tesis Doctoral, la extracción directa de los analitos en un disolvente supramolecular constituido por micelas inversas de ácido decanoico en tetrahidrofurano-agua, previamente sintetizado mediante un proceso de coacervación. El primer método se aplica a la determinación de ácido oxolínico y flumequina, dos antibióticos del grupo de las quinolonas ampliamente utilizados en explotaciones piscícolas, y el segundo a la determinación de ocho antibióticos del grupo de las sulfonamidas: sulfadiazina, sulfamerazina, sulfametoxipiridazina, sulfaclopiridazina, sulfadoxina, sulfametoxazol, sulfadimetoxina y sulfaquinoxalina, de uso general en explotaciones ganaderas. En ambos casos la determinación de los analitos se realiza directamente en el extracto supramolecular mediante su inyección en un cromatógrafo de líquidos utilizando detección fluorimétrica. En el caso de las sulfonamidas se lleva a cabo la derivatización precolumna de los analitos usando fluorescamina como reactivo derivatizador. Las muestras analizadas han sido salmón, trucha, lubina, dorada, gallo y langostinos producidos en piscifactorías y carne de cerdo, ternera, pollo, pavo y cordero.

PARTE III: Extracción en fase sólida supramolecular de drogas terapéuticas en muestras acuosas medioambientales. Tras discutir aspectos generales de la extracción en fase sólida (SPE) supramolecular, se presentan los resultados obtenidos en las investigaciones realizadas para evaluar la capacidad de los adsorbentes supramoleculares para extraer y preconcentrar drogas terapéuticas consideradas contaminantes medioambientales emergentes. Las drogas investigadas fueron ibuprofeno y naproxeno, dos principios activos frecuentemente detectados en muestras acuosas medioambientales y el adsorbente supramolecular usado para su extracción, hemimicelas de SDS formadas sobre alúmina. Además de desarrollar un nuevo método que permite determinar ambos analitos en aguas residuales a concentraciones del orden de los ng L⁻¹ basado en SPE hemimicelar, cromatografía líquida y detección fotométrica, se realizan diferentes estudios para establecer el mecanismo a través del cual se produce la adsolubilización de ibuprofeno y naproxeno sobre las hemimicelas de SDS. El nuevo método desarrollado se aplica al análisis de muestras de influentes y efluentes de tres plantas de tratamiento de aguas residuales andaluzas.

En la Memoria también se incluye un apartado en el que se resumen y discuten todos los resultados obtenidos en las investigaciones realizadas en esta Tesis Doctoral

de forma conjunta, destacando las aportaciones más destacadas e innovadoras, y un apartado dedicado a exponer las principales conclusiones obtenidas en los trabajos de investigación desarrollados.

Finalmente, en el apéndice A se enumeran los artículos científicos publicados en revistas internacionales especializadas a los que ha dado lugar esta Tesis Doctoral y en el apéndice B, las comunicaciones realizadas a Congresos nacionales e internacionales.



INTRODUCCIÓN

1. DROGAS TERAPÉUTICAS

1.1. Aspectos generales

1.1.1. Definiciones y clasificación

Las *drogas terapéuticas* son sustancias químicas puras utilizadas en el tratamiento, cura, prevención o diagnóstico de enfermedades, o para evitar la aparición de procesos fisiológicos indeseables (ej. el albuterol o terbutalina son broncodilatadores que evitan el asma bronquial, es decir, evitan la constricción de los bronquios e inflamación de su mucosa). Se pueden obtener de fuentes naturales (vegetales, animales o minerales) o mediante diferentes procesos de síntesis.

Un *medicamento* está constituido por una droga terapéutica o conjunto de ellas integradas en un preparado farmacéutico. Se utilizan tanto para uso humano como veterinario, y en este último caso, también se consideran *medicamentos* las premezclas que se añaden como aditivos alimentarios a los piensos medicamentosos (BOE de 27 de julio de 2006, número 178). El número de drogas terapéuticas usadas en medicina humana y veterinaria es muy elevado (> 3.000). Los medicamentos se administran con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas, ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico o veterinario. Los medicamentos se clasifican en varios grupos según su mecanismo de acción y estructura. En la Tabla 1 se muestran los grupos más importantes.

El consumo anual mundial de medicamentos ha aumentado sustancialmente en los últimos años [1,2]. En España se prevé que esta tendencia continúe debido a un aumento del envejecimiento y el poder adquisitivo de la población y al creciente interés social por los temas de salud y prevención. Según datos recientes del Ministerio de Sanidad y Consumo [3], el gasto farmacéutico público en España creció entre febrero de 2008 y enero de 2009 un 6,9% con respecto al mismo período del año anterior, alcanzando un gasto total de 11.981,9 millones de euros. Entre los medicamentos más consumidos en nuestro país se encuentran los antiinflamatorios no esteroideos, cuyo consumo ha aumentado en un 74,2% entre 1992 y 2006, siendo los derivados arilpropiónicos (ej. ibuprofeno) los que más han contribuido a este incremento [4]. El aumento en el consumo de antibióticos ha sido considerablemente inferior (2,7% entre 2001 y 2006) siendo las β -lactamas, quinolonas y macrólidos los más utilizados [5].

Tabla 1. Clasificación de las drogas terapéuticas en función de su mecanismo de acción y estructura o función

Grupo terapéutico	Estructura/Función	Ejemplos
Antibióticos	Sulfonamidas	Sulfadiazina y sulfametoxazol
	Tetraciclinas	Tetraciclina y clortetraciclina
	Quinolonas	Flumequina y ácido oxolínico
	Macrólidos	Eritromicina y azitromicina
	β -lactamas	Amoxicilina y ampicilina
	Fusidanos	Ácido fusídico y fusidato sódico
Analgésicos y antiinflamatorios	Derivados del ácido propiónico	Ibuprofeno, naproxeno, y ketoprofeno
Reguladores lipídicos	Derivados del ácido fibrico	Ácido clofíbrico y bezafibrato
β-bloqueantes	Antagonistas beta	Sotalol y omeprazol
Contraceptivos	Hormonas	Estradiol y estrona
	Espermicidas	Cloruro de benzalconio
Drogas psicotrópicas	Antiepilépticos	Carbamazepina y clorazepato
	Antidepresivos	Fluoxetina y paroxetina
	Antipsicóticos	Clozapina y olanzapina
	Ansiolíticos	Diazepam y lorazepam
	Estimulantes	Dopamina y noradrenalina
	Anticolinérgicos	Atropina y flavoxato
Antiparasitarios	Antihelmínticos	Ivermectina
	Antiprotozoarios	Albendazol
Otros	Contrastes radiológicos	Iohexol
	Antisépticos	Cloruro de cetalconio y cetrimida

1.1.2. Control de calidad de fármacos

El concepto de calidad de un medicamento incluye dos características básicas: eficacia y seguridad. La eficacia se refiere a su capacidad para obtener la acción terapéutica buscada, y se acepta que un medicamento es seguro cuando los riesgos para el paciente son aceptables teniendo en cuenta el balance de riesgos frente a beneficios.

Existen varios factores que deben considerarse en relación a la calidad de un medicamento, entre los que se incluyen el procedimiento de elaboración del mismo, la pureza y estabilidad del principio activo en el producto final, la calidad de los aditivos adicionados y la solubilidad del medicamento una vez ingerido. Así, se considera que un medicamento es de calidad cuando contiene el principio activo correspondiente con la concentración y pureza especificadas. En caso contrario, los medicamentos pueden ser ineficaces e incluso peligrosos para los pacientes. La baja calidad de determinados medicamentos se debe a negligencias, errores humanos, insuficiencia de recursos financieros y humanos o falsificaciones.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) [6], en los países desarrollados se han detectado problemas de calidad en algunos medicamentos usados para reducir el colesterol, suplir el déficit de la hormona del crecimiento y tratar el cáncer, y en los países en desarrollo, en los medicamentos utilizados para el tratamiento de enfermedades que pueden ser mortales como el paludismo, la tuberculosis y el SIDA. También es frecuente encontrar antibióticos de baja calidad.

La circulación de medicamentos de baja calidad constituye un problema clínico y de salud pública, y por tanto, es fundamental disponer de métodos simples, rápidos y exactos que permitan controlar la calidad de los mismos con el mínimo coste posible. Estas características son deseables para los métodos usados por la industria farmacéutica en general e imprescindibles para los países en desarrollo.

1.1.3. Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal

En la producción de animales de consumo humano se utiliza una gran variedad de productos farmacológicos con fines terapéuticos, profilácticos o como promotores del crecimiento. Los alimentos procedentes de animales tratados con estos productos

pueden contener residuos de los mismos o sus metabolitos. Los productos alimenticios susceptibles de contener residuos de medicamentos son la carne, el pescado, la leche, los huevos y la miel.

La administración de productos farmacológicos es necesaria, pero cuando se utilizan de forma fraudulenta, indiscriminada y abusiva, sin atender a los principios de la buena práctica veterinaria, puede suponer un grave riesgo para la salud de los consumidores. Por este motivo, la Unión Europea ha elaborado leyes que regulan de forma estricta el uso de medicamentos veterinarios. El Reglamento 2377/90/EC [7] describe el procedimiento para establecer los límites máximos de residuos (LMR) para medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal, definiendo el LMR como la concentración máxima de residuo resultante del uso de un medicamento veterinario (expresado en mg Kg⁻¹ o µg Kg⁻¹ del peso en fresco), que es aceptable en un alimento. Los LMR se calculan a partir de la dosis diaria admisible (DDA), establecida de acuerdo al tipo y cantidad de residuo que se considere que no constituye ningún riesgo para la salud humana, o a partir de un DDA temporal que utiliza un factor de seguridad adicional. Cuando se establece un LMR en productos de origen animal se deben tener en cuenta los residuos ingeridos por los consumidores a través de alimentos de origen vegetal y los que proceden del medio ambiente. Los LMRs, además, pueden reducirse con el objeto de que sean coherentes con la cantidad de residuos de drogas que contienen los alimentos cuando se realiza una correcta utilización de los medicamentos veterinarios, y ello, en la medida en que se disponga de métodos de análisis lo suficientemente sensibles para determinar los residuos a las concentraciones requeridas.

Los LMRs se adoptan después de la evaluación científica pertinente del Comité de medicamentos veterinarios, teniendo en cuenta además otras evaluaciones científicas realizadas por determinados organismos, en particular el Codex Alimentarius. Los límites máximos de residuos se establecen especificando las especies en las que pueden estar presentes los residuos, los niveles que podemos encontrar en cada uno de los tejidos obtenidos del animal tratado (ej. músculo, grasa, hígado o riñón) y la naturaleza del residuo (residuo marcador).

En el Reglamento 2377/90/EC, las sustancias farmacológicamente activas que pueden encontrarse en alimentos de origen animal se clasifican en cuatro grupos:

a) Sustancias para las que se han establecido LMRs definitivos (Anexo I).

b) Sustancias para las que no es necesario fijar un LMR provisional, ya que son consideradas como seguras y no conllevan riesgos para la salud humana. Su uso está permitido en las especies animales indicadas en el Reglamento y de acuerdo con las condiciones establecidas en éste (Anexo II).

c) Sustancias para las que se fija un LMR provisional, ya que no existen datos suficientes de que constituyan un riesgo para la salud pública. El LMR provisional no debe exceder los 5 años de vigencia (Anexo III).

d) Sustancias para las que no cabe establecer un LMR ya que constituyen un riesgo para la salud del consumidor, sea cual sea su nivel de concentración en los alimentos (Anexo IV).

La Directiva 96/22/EC [8] establece la prohibición del uso de agentes promotores del crecimiento, tales como hormonas y β -agonistas, y la Directiva 96/23/EC [9] fija las medidas para el control de residuos en productos de origen animal (sustancias farmacológicamente activas, contaminantes medioambientales, colorantes, elementos químicos, etc) y divide a éstos en dos grupos (Tabla 2). El grupo A incluye las sustancias prohibidas para las que no se ha establecido un LRM de acuerdo al anexo IV del Reglamento 2377/90/EC [7]; y el grupo B comprende todas las drogas veterinarias registradas de acuerdo a los anexos I y III del Reglamento 2377/90/EC [7]. Además, la Directiva 96/23/EC [9] establece la vigilancia de la cadena de producción animal y de sus productos primarios (carne, leche, huevos y miel) a través del Programa Nacional de Vigilancia para la monitorización de los residuos en alimentos de origen animal. El control del Grupo A es prioritario e implica el análisis de un gran número de muestras con criterios muy estrictos, ya que la presencia de sustancias pertenecientes a este grupo en los alimentos puede ocasionar serios problemas para la salud pública. Las muestras tomadas por el Programa Nacional de Vigilancia son analizadas en laboratorios acreditados. En Europa, sólo existen 4 laboratorios acreditados para realizar este tipo de análisis, situados en Alemania, Italia, Francia y los Países Bajos, cada uno de ellos responsabilizándose del control de un conjunto de residuos de los indicados en la Tabla 2. Los requisitos que deben cumplir los métodos usados para el análisis de muestras oficiales, tomadas de conformidad con la Directiva 96/23/CE [9], se establecieron en la Decisión 2002/657/CE [10] donde también se fijaron los criterios comunes de interpretación de los resultados analíticos obtenidos para dichas muestras por los laboratorios oficiales de control.

Tabla 2. Drogas no autorizadas y aquellas para las que se han establecido valores de LMR de acuerdo con la Directiva 96/22/EC y el Reglamento 2377/90/EC

Grupo A: sustancias que tienen efectos anabólicos y sustancias no autorizadas

Estilbenos, derivados de los estilbenos y sus sales y ésteres
Agentes con efectos nocivos sobre el tiroides
Esteroides
Lactosas del ácido resorcílico, incluido el zeranol
 β -Agonistas
Componentes incluidos en el Anexo IV del Reglamento 2377/90/EC

Grupo B: Drogas veterinarias y contaminantes

Sustancias antibacterianas, incluidas sulfonamidas y quinolonas
Otras drogas veterinarias:
 Antihelmínticos
 Anticoccidios, incluyendo nitroimidazoles
 Carbamatos y piretroides
 Carbadox y olaquinox
 Sedantes
 Drogas antiinflamatorias no esteroideas
 Otras sustancias con actividad farmacológica
Otras sustancias y contaminantes medioambientales:
 Compuestos organoclorados, incluyendo PCBs
 Compuestos organofosforados
 Elementos químicos
 Micotoxinas
 Colorantes
 Otros

En Europa existe un sistema de alertas alimentarias, denominado Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), que se estableció en 1978, (aunque no se legisló hasta 1984) con el fin de asegurar la calidad e inocuidad de los productos alimentarios que circulan libremente por la Unión Europea o se importan de países no comunitarios. En el año 2002, a través del Reglamento 178/2002/CE (DO L 31 de 1.2.2002, p.1/24) se revisaron los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se creó la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijaron procedimientos para garantizar la seguridad alimentaria. A partir de ese momento, el sistema de alerta comenzó a

aplicarse a los alimentos de consumo humano y animal. El número de notificaciones tramitadas a través del RASFF ha aumentado considerablemente en los últimos años (desde 823 en el año 2000 hasta 7354 en 2007). Las notificaciones debidas a la presencia de concentraciones no permitidas de residuos de drogas veterinarias, aditivos, micotoxinas, plaguicidas, etc. [11] proceden fundamentalmente del control del mercado interno europeo y del control de fronteras, pero también de quejas realizadas por los consumidores y del control interno de empresas.

1.1.4. Fuentes y efectos de las drogas terapéuticas en el medioambiente

La excreción de las drogas terapéuticas consumidas por personas y animales, en su forma original o como metabolitos, constituye la principal ruta de entrada de estos contaminantes en los sistemas acuáticos naturales, ya que dichas drogas no son totalmente eliminadas en las plantas de tratamiento de aguas residuales. Otras rutas de entrada, tal como se muestra en la Figura 1 [12], son el vertido de medicamentos no usados o caducados y de efluentes procedentes de la industria farmacéutica. La contaminación del suelo se debe fundamentalmente al uso de lodos y estiércol como fertilizantes, y la escorrentía o filtración del agua a través de suelos contaminados puede originar la contaminación de las aguas subterráneas dificultando su uso para el consumo humano.

La contaminación por drogas terapéuticas en los distintos compartimentos ambientales constituye un problema ambiental especialmente grave debido a la persistencia de estos compuestos y su elevada toxicidad para organismos acuáticos y terrestres. Además, el efecto nocivo de determinadas drogas se potencia debido al efecto sinérgico originado por las mezclas de fármacos en el medioambiente.

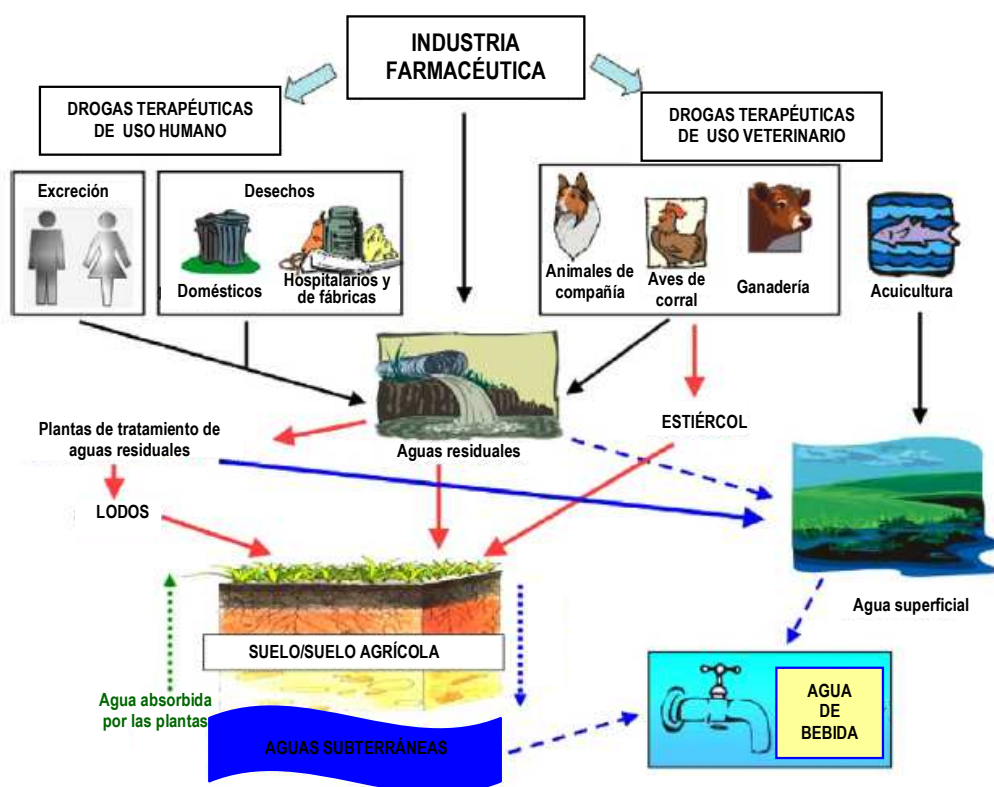


Figura 1. Principales rutas de entrada en el medioambiente de las drogas terapéuticas usadas en medicina humana y veterinaria.

Experimentos realizados en condiciones controladas en el laboratorio han demostrado que las drogas alteran el desarrollo post-germinativo de las plantas afectando al crecimiento de la raíz, tallo y hojas, siendo este efecto más acusado con el tiempo. En este contexto, se debe prestar especial atención a la presencia de sulfonamidas y tetraciclinas en suelos debido a su elevada capacidad de adsorción y a su persistencia.

Las drogas terapéuticas también pueden ser nocivas para los organismos acuáticos, aunque, en la mayoría de los casos su efecto se produce a concentraciones superiores a las encontrados en las aguas naturales (desde ng/L a pocos µg/L) [13]. Algunas drogas como el ácido salicílico, diclofenaco, propanolol, ácido clofibrico, carbamazepina y fluoxetina causan su efecto nocivo a largo plazo, y otras como el α-etinilestradiol, ejercen su efecto a concentraciones muy bajas. Esta hormona origina alteraciones de los órganos sexuales de los peces y una disminución de su fertilidad. Por último, la presencia de antibióticos de uso humano y veterinario en el medio ambiente es

especialmente preocupante, ya que pueden contribuir al desarrollo de bacterias resistentes. Este problema se ha detectado en piscifactorias debido al uso de antibióticos tales como la oxitetraciclina, el ácido oxolínico, la eritromicina y la flumequina [14-17]; o de mezclas de diferentes principios activos, como por ejemplo, mezclas de oxitetraciclina, sulfadimetoxina, ormetoprim y amoxicilina [18], o de ácido oxolínico, oxitetraciclina y furazolidone [19].

Las drogas terapéuticas se consideran contaminantes ambientales emergentes [20] que deben ser controladas en los sistemas acuáticos. Con este fin, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de EE.UU. han establecido la obligatoriedad de realizar una evaluación de riesgos ambientales (ERA) antes de la comercialización de un nuevo medicamento. Esta evaluación supone, en una primera etapa, la estimación de la concentración de droga terapéutica o sus metabolitos que podemos encontrar en el medioambiente (PEC, “predicted environmental concentration”). Si el valor del PEC no supera los $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ no es necesaria ninguna evaluación adicional. Sin embargo, si el PEC es superior a $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$, se debe determinar hasta qué concentración no se producen efectos adversos mediante la realización de test de ecotoxicidad aguda con algas (EMA) o Daphnia y pescado (FDA). Con estos datos se calculan los valores de concentración media efectiva (EC_{50}), dosis letal (LC_{50}) y la concentración máxima para la que no se observan efectos nocivos (NOEC, “no observed effect concentration”). El que los resultados de los estudios realizados indiquen que existe un riesgo medioambiental inaceptable, no implica la prohibición del nuevo medicamento, pero sí la limitación de su uso a casos de extrema necesidad y su inclusión en programas de monitorización medioambiental. La concentración medida en el medioambiente (MEC) para una determinada droga terapéutica permite realizar una evaluación de riesgos más realista que el PEC, pero esta concentración se desconoce en la mayoría de los casos.

La Directiva de la UE que regula la calidad del agua destinada al consumo humano (Directiva 98/83/EC [21]) no contempla los residuos de medicamentos. En EE.UU. existen alrededor de 170 Agencias de Protección Medioambiental del agua de bebida, pero ninguna de ellas tiene en cuenta tampoco estos residuos [22].

1.2. Drogas terapéuticas investigadas

Las drogas terapéuticas objeto de las investigaciones que se presentan en esta Memoria pertenecen a diferentes grupos terapéuticos (antibióticos, antiinflamatorios, antisépticos y contraceptivos) y son ampliamente usadas en medicina humana o veterinaria. En la Tabla 3 se muestran las familias de compuestos pertenecientes a los diferentes grupos terapéuticos seleccionados y la estructura química de cada uno de ellos. También se incluyen los diferentes tipos de muestras analizadas y la función del sistema supramolecular en el análisis. Los problemas analíticos estudiados se seleccionaron considerando su interés en diferentes ámbitos: industria farmacéutica, alimentación y medioambiente. Dada la diversidad de drogas y matrices abordadas, los resultados obtenidos en las investigaciones que se presentan constituyen un punto de referencia sobre la aplicabilidad de los sistemas supramoleculares en la determinación de drogas terapéuticas.

1.2.1. *Propiedades físico-químicas*

Las drogas terapéuticas investigadas son sustancias anfífilas, es decir, en su estructura molecular presentan regiones hidrófilas e hidrófobas. Por lo tanto, tienen la capacidad de formar agregados mixtos con los tensioactivos que integran los sistemas supramoleculares investigados en esta Tesis Doctoral, siendo éste, el fundamento de todas las determinaciones y extracciones que se presentan en esta Memoria.

La mayoría de los principios activos estudiados poseen grupos ácidos y/o básicos en su estructura molecular, por lo que la especie o especies presentes en medios acuosos (catiónica, aniónica o neutra) varían en función del pH, así como su solubilidad, absorptividad molar en el UV y reactividad. Las formas ionizadas de las drogas son las más solubles en agua, mientras que la forma neutra, posee mayor permeabilidad a través de las membranas. Conociendo el valor o los valores de pK_a de las drogas es posible estimar su absorción, metabolización y distribución en los sistemas biológicos y en el medioambiente. En la Tabla 4 se muestran los valores de pK_a y el coeficiente de distribución octanol-agua ($\log K_{ow}$) para los antibióticos y antiinflamatorios no esteroideos estudiados en esta Tesis Doctoral. No se incluyen en la tabla los tensioactivos catiónicos estudiados. Estos compuestos poseen una carga permanente positiva y su hidrofobicidad aumenta al aumentar la longitud de la cadena hidrocarbonada.

Table 3. Estructura química de las drogas terapéuticas estudiadas, muestras analizadas y función del sistema supramolecular

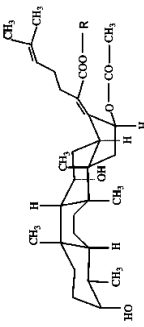
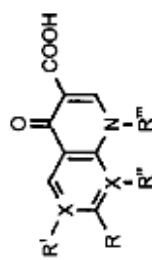
Grupo terapéutico	Estructura química general	Drogas estudiadas		Muestras analizadas	Función sistema supramolecular
		R, R', R'', R''' y X	Análito		
Antibióticos	Fusidanos 	R = -H	Ácido Fusídico	Fármacos (pastillas, cremas y pomadas)	Determinación
	Quinolonas 	R = -Na	Fusidato sódico	Salmón, trucha, gallo, dorada, lubina y gamba	Preparación de la muestra extracción/ concentración
		X = -H R-R' = -O-CH ₂ -O- R'' = -H R''' = -CH ₂ -CH ₃	Ácido oxolínico		
		X = -H R = -H R' = -F R''-R''' = -CH(CH ₃)-CH ₂ -CH ₂ -	Flumequina		

Table 3. Continuación

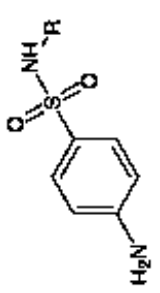

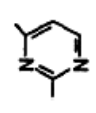
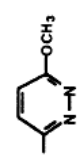
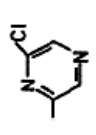
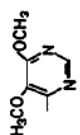

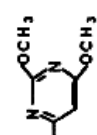

Grupo terapéutico	Estructura química general	Drogas estudiadas		Muestras analizadas	Función sistema supramolecular
		R, R', R'', R''' y X	Analito		
Antibióticos	<p>Sulfonamidas</p> 		Sulfadiazina	Carne de cerdo, pollo, pavo, cordero y ternera	Preparación de la muestra extracción/ concentración
			Sulfamerazina		
			Sulfametoxipiridazina		
			Sulfacoloropiridazina		
			Sulfadoxina		
			Sulfametoxazol		
			Sulfadimetoxina		
			Sulfaquinoxalina		

Table 3. Continuación

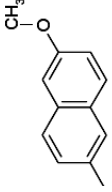
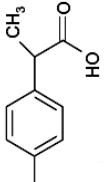
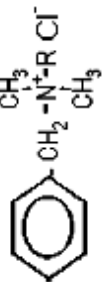
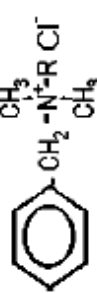
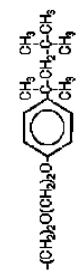
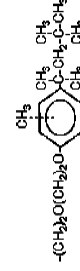
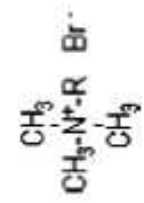

Grupo terapéutico	Estructura química general	Drogas estudiadas		Muestras analizadas	Función sistema supramolecular
		R, R', R'', R''' y X	Analito		
Antiinflamatorios no esteroideos	Ácidos arilpropiónicos R - CH (CH ₃) - COOH		Naproxeno	Aguas residuales	Preparación de la muestra extracción/ concentración
			Ibuprofeno		
Contraceptivos	Cloruros de alquildimetilbencilamonio 	- C ₈ H ₁₇ a - C ₁₃ H ₃₇	Cloruro de benzalconio	Fármacos (crema)	Determinación

Table 3. Continuación

Grupo terapéutico	Estructura química general	Drogas estudiadas		Muestras analizadas	Función sistema supramolecular	
		R, R', R'', R''' y X	Análito			
Antisépticos	Cloruros de alquilmetilbencilamonio	- (CH ₂) ₁₁ -CH ₃	Cloruro de dodecylbenzalconio	Fármacos (cremas, disoluciones y polvos)	Determinación	
		- (CH ₂) ₁₅ -CH ₃	Cloruro de cetalconio			
		Cloruro de benettonio				
		Cloruro de metilbenettonio				
Bomuros de alquiltrimetilamonio		-C ₈ H ₁₇ a -C ₁₈ H ₃₇	Cloruro de benzalconio			
Cloruros de alquilpiridinio		- (CH ₂) ₁₅ -CH ₃	Bromuro de cetrimonio			
		- (CH ₂) ₁₅ -CH ₃ to - (CH ₂) ₁₁ -CH ₃	Cetrimida			
		- (CH ₂) ₁₅ -CH ₃	Cloruro de cetilpiridinio			

Las drogas estudiadas poseen anillos aromáticos y grupos donadores y/o aceptores de protones en su estructura química (Tabla 3), por lo tanto, su interacción con los tensioactivos que integran los sistemas supramoleculares investigados puede producirse a través de interacciones π -catión y/o formación de puentes de hidrógeno, además de interacciones electrostáticas y/o hidrofóbicas.

Tabla 4. Propiedades físico-químicas de los antibióticos y antiinflamatorios no esteroideos investigados

Grupo terapéutico	Droga terapéutico	logK _{ow}	pK _a values
Antibióticos			
Fusidanos	Ácido fusídico	6,75	3,80
Quinolonas	Ácido oxolínico	0,94	6,87
	Flumequina	1,60	6,65
Sulfonamidas	Sulfadiazina	-0,09	1,64; 6,50
	Sulfamerazina	0,14	1,64; 6,98
	Sulfametoxipiridazina	0,32	2,18; 7,19
	Sulfaclopiridazina	0,31	1,88; 5,90
	Sulfadoxina	0,70	1,59; 6,16
	Sulfametoxazol	0,89	1,39; 5,81
	Sulfadimetoxina	1,63	1,30; 6,21
	Sulfaquinoxalina	1,68	1,77; 5,65
Antiinflamatorios no esteroideos	Naproxeno	3,20	4,20
	Ibuprofeno	4,00	4,90

1.2.2. Actividad farmacológica

Tal como indicamos anteriormente, las drogas terapéuticas son sustancias químicas utilizadas en el tratamiento, cura, prevención o el diagnóstico de enfermedades, o para evitar la aparición de procesos fisiológicos no deseados. A continuación se detalla la actividad farmacológica de cada uno de los grupos de principios activos investigados en esta Tesis Doctoral.

a) **Los antibióticos fusidanos** son agentes antimicrobianos usados en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias grampositivas, especialmente infecciones estafilocócicas, debido a su buena actividad frente a estos microorganismos y a la

ausencia de resistencia cruzada con otros antimicrobianos como metilcilina, rifampicina y macrólidos. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis de la cadena polipeptídica de la bacteria en formación. Se usan en medicina humana para el tratamiento de infecciones oculares y de la piel.

b) **Los tensioactivos catiónicos** son sales de amonio cuaternario usados como principios activos antimicrobianos en fármacos de uso humano debido a su elevado poder desinfectante. Son muy efectivos frente a bacterias grampositivas y, en menor grado, a bacterias gramnegativas. También se usan como contraceptivos, fungicidas y virucidas.

c) **Los antiinflamatorios no esteroideos** son un grupo variado y químicamente heterogéneo de fármacos con acción antiinflamatoria, analgésica y antipirética, que ejercen su efecto por inhibición de la enzima ciclooxigenasa. Los más usados son el ibuprofeno y naproxeno, derivados del ácido propiónico, cuyo mecanismo de acción consiste en la interrupción de la síntesis de las prostaglandinas, importantes mediadores del dolor, fiebre e inflamación.

d) **Las quinolonas** son bactericidas. Bloquean la replicación del ADN bacteriano mediante la inhibición de la subunidad A de la enzima ADN girasa. Presentan un amplio espectro de acción frente a bacterias gramnegativas y determinadas bacterias grampositivas. Las quinolonas se usan en medicina humana y veterinaria para el tratamiento de infecciones gastrointestinales, respiratorias y urinarias.

e) **Las sulfonamidas** son agentes antibacterianos sintéticos ampliamente usados para el tratamiento de infecciones bacterianas. Son fármacos análogos al ácido paraaminobenzoico (PABA), y por tanto, actúan como antagonistas competitivos de éste, inhibiendo la síntesis del ácido fólico bacteriano. El hecho de que las bacterias tengan que sintetizar su propio ácido fólico, a diferencia de las células eucariotas de los mamíferos que obtienen el ácido fólico de los alimentos ingeridos, hace que éstas sean más sensibles a la acción de las sulfonamidas que el huésped. Las sulfonamidas se usan en medicina humana para el tratamiento de infecciones urinarias. En medicina veterinaria se utilizan de forma rutinaria en animales de granja y en piscifactorias con fines profilácticos y terapéuticos, o como agentes promotores del crecimiento.

1.2.3. Residuos de antibióticos en los productos alimenticios de origen animal

Las quinolonas y sulfonamidas estudiadas en esta Memoria pueden encontrarse como residuos en alimentos de origen animal, debido a que, como hemos comentado anteriormente, se usan frecuentemente para el tratamiento de infecciones y como promotores del crecimiento de los animales de granja y piscifactorias. La existencia de residuos de estos antibióticos en los alimentos debe controlarse estrictamente para evitar el desarrollo de reacciones alérgicas, hipersensibilidad y problemas de resistencia bacteriana en humanos y en los organismos vivos de los sistemas acuáticos. Con este fin, países del mundo desarrollado (Europa, USA, Japón) y en vías de desarrollo (Asia y Latino América) han establecido valores de LMR para quinolonas y sulfonamidas en alimentos. En la Tabla 5 se muestran los límites legales establecidos para estas drogas en Europa [31-33].

Tabla 5. LMR para las quinolonas y sulfonamidas estudiadas

QUINOLONAS				
<i>Droga terapéutica</i>	<i>Residuo marcador</i>	<i>Especie animal</i>	<i>LMR</i>	<i>Tejido diana</i>
Ácido oxolínico	Ácido oxolínico	Pescado	100 µg Kg ⁻¹	
Flumequina	Flumequina	Pescado	600 µg Kg ⁻¹	(1)
SULFONAMIDAS				
<i>Droga terapéutica</i>	<i>Residuo marcador</i>	<i>Especie animal</i>	<i>LMR</i>	<i>Tejido diana</i>
Todas las sustancias que pertenecen al grupo de las sulfonamidas	Medicamento base	Todas las especies productoras de alimentos	100 µg Kg ⁻¹	(2)

(1) Músculo y piel en proporciones normales

(2) Músculo, hígado, riñón y grasa. Los residuos combinados totales de todas las sustancias del grupo de las sulfonamidas no deben sobrepasar los 100 µg Kg⁻¹

1.2.4. Drogas antiinflamatorias no esteroideas en el medioambiente

Los antiinflamatorios no esteroideos son uno de los grupos farmacológicos más consumidos a nivel mundial debido a su versatilidad como analgésicos y antiinflamatorios

y a que pueden adquirirse sin prescripción médica. De hecho, en 2004 fue el sexto grupo farmacológico con mayor facturación [23].

La concentración de antiinflamatorios no esteroideos en aguas residuales y superficiales oscila entre los ng L⁻¹ y los µg L⁻¹. Estas concentraciones relativamente elevadas se deben al elevado consumo de estos principios activos y a la ineficacia de las plantas de tratamiento de aguas residuales para su eliminación. Ibuprofeno y naproxeno son las drogas antiinflamatorias detectadas con más frecuencia. En aguas superficiales, la concentración varía entre 10 y 250 ng L⁻¹ para ibuprofeno y entre 8 y 280 ng L⁻¹ para naproxeno [1], aunque en determinados ríos se han encontrado concentraciones más elevadas (por ej. 1,6 µg L⁻¹ de ibuprofeno y 1,5 µg L⁻¹ de naproxeno en ríos de Cataluña [24]). En los efluentes procedentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales, las concentraciones se encuentran dentro de los intervalos 0,01-8 y 0,02-12,5 µg L⁻¹ para ibuprofeno y naproxeno, respectivamente [25].

La continua presencia de estas drogas en el medioambiente puede causar efectos nocivos en los organismos acuáticos y terrestres. Recientemente, se ha demostrado que cuando los periodos de exposición son cortos el ibuprofeno y el naproxeno ejercen su efecto sobre peces, zooplancton y fitoplancton, a concentraciones mayores a 100 mg L⁻¹ [26-29], concentraciones muy superiores a las concentraciones encontradas en el medioambiente. Sin embargo, cuando el periodo de exposición es mayor, se observan efectos crónicos sobre los organismos vivos a los niveles de concentraciones existentes en las aguas superficiales y residuales. La concentración mínima de naproxeno necesaria para que se produzca toxicidad aguda en *Daphnia Magna* y *Ceriodaphnia Dubia* tras un periodo de exposición de 48 horas es de 66,4 mg L⁻¹, mientras que los efectos de toxicidad crónicos con una exposición continuada de 21 días se observa a concentraciones de naproxeno superiores a 0,33 mg L⁻¹ [30].

2. SISTEMAS SUPRAMOLECULARES EN QUÍMICA ANALÍTICA

2.1. Conceptos generales

La Química Supramolecular es la ciencia que estudia las estructuras y funciones de las entidades formadas por la asociación de dos o más sustancias químicas unidas mediante enlaces intermoleculares [34]. El enlace intermolecular es un término genérico que incluye interacciones electrostáticas, hidrófobas, hidrófilas, enlaces de hidrógeno, enlaces π - π , interacciones de Van der Waals, etc. La característica común de todas estas interacciones es que no son covalentes y por lo tanto, las entidades formadas lo hacen a través de procesos reversibles. A las entidades objeto de estudio de la Química Supramolecular se les denomina sistemas supramoleculares.

La Química Supramolecular es claramente distinguible de la Química Molecular, que estudia las características de los sistemas formados por átomos unidos mediante enlaces covalentes a través de reacciones irreversibles. Las moléculas, que son objeto de estudio en Química Molecular, constituyen los componentes a partir de los cuales se forman los sistemas supramoleculares. Los enlaces intermoleculares en estos sistemas son en general más débiles que los enlaces covalentes. Por tanto, comparadas con las moléculas, las especies supramoleculares son termodinámicamente menos estables, cinéticamente más lábiles y dinámicamente más flexibles [35-37].

La Química Supramolecular no debe considerarse como una nueva disciplina en Química sino que es el resultado del interés científico por conocer cuál es la función de cada molécula en los sistemas naturales y cómo pueden y deben conectarse entre sí para que el conjunto presente nuevas propiedades o funciones más complejas. Es decir, el objetivo de esta disciplina es posibilitar la manipulación controlada de la materia de modo que sus constituyentes más básicos actúen de forma sinérgica generando sistemas moleculares que se comporten como entes capaces de ejecutar funciones cada vez más complejas [38-40].

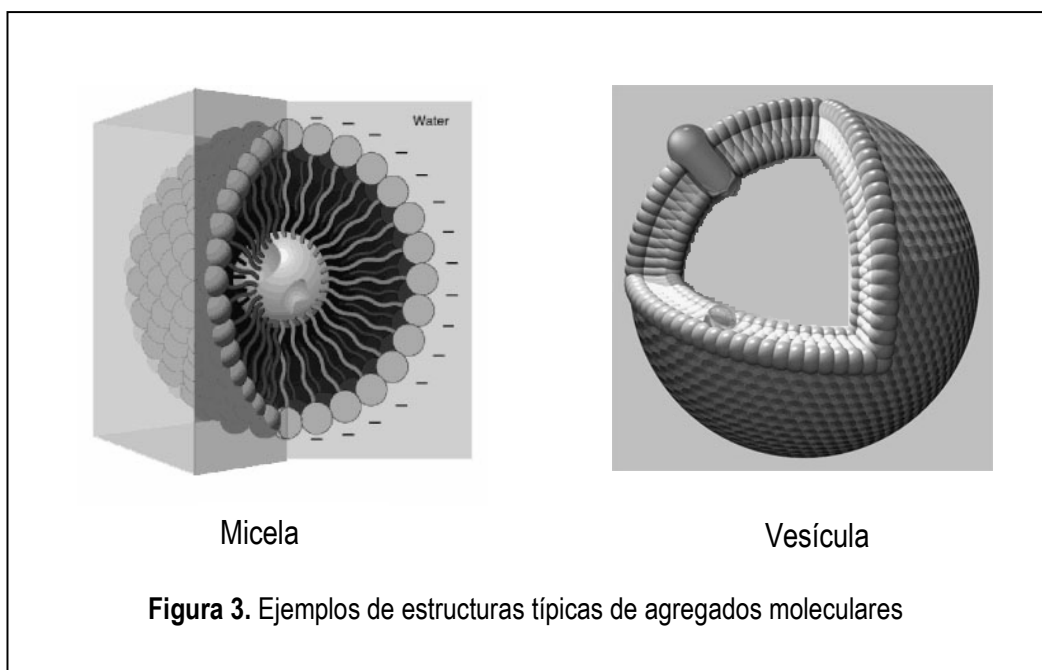
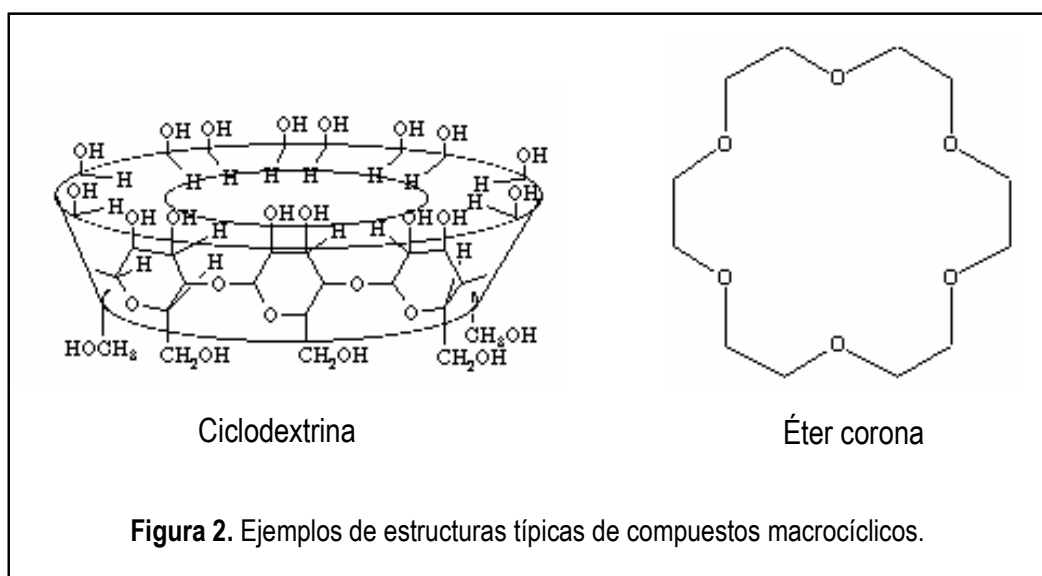
La Química Supramolecular tiene un elevado carácter multidisciplinar. Se ubica en el punto de intersección de la Química, la Biología y la Física. Los pilares sobre los que se fundamentan son los procedimientos de síntesis, la Química de la coordinación y complejación entre ligandos e iones metálicos, los estudios físico-químicos de las interacciones intermoleculares, los procesos biológicos y bioquímicos, la ciencia de los

materiales, etc. Por lo tanto, la Química Supramolecular abarca las características químicas, físicas y biológicas de los sistemas supramoleculares y muchos científicos hablan ya de Ciencia Supramolecular como la ciencia que abarca todos los aspectos básicos y aplicados de estos sistemas [34-40].

2.2. Clasificación

Los sistemas supramoleculares se clasifican en dos grandes grupos [41]: supermoléculas y agregados moleculares. Las supermoléculas son especies oligomoleculares de estructura definida formadas mediante la asociación intermolecular de dos o tres componentes. Constituyen los denominados sistemas anfitrión-huésped o receptor-substrato. El anfitrión o receptor es un compuesto macrocíclico (éter corona, éter cripta, ciclodextrina, etc.) (Figura 2) que enlaza con el substrato de forma reversible y selectiva, siguiendo los principios de reconocimiento molecular. Los agregados moleculares son entidades polimoleculares formadas a partir de la asociación espontánea de un número indefinido de componentes que constituyen una fase específica con características macroscópicas y organización microscópica más o menos definida, dependiendo de su naturaleza. Los agregados de mayor interés en Química Analítica son micelas, microemulsiones y vesículas (Figura 3).

La característica esencial de los sistemas supramoleculares es que, debido a que las moléculas que los integran contienen en su estructura una parte hidrófoba y otra hidrófila y/o contienen centros aceptores o donadores de protones [42], poseen regiones con diferente polaridad, acidez y viscosidad donde los solutos se pueden solubilizar y que son responsables de los efectos microambientales que ejercen sobre los sistemas químicos. Estos dos aspectos (solubilización y efectos microambientales) constituyen el fundamento de la mayoría de las aplicaciones analíticas de los sistemas supramoleculares.



2.3. Interacciones sistema supramolecular-sistemas químico

La interacción entre un sistema supramolecular y un sistema químico origina cambios en las características físico-químicas de ambos sistemas. En la Figura 4 se muestran esquemáticamente los efectos derivados de esta interacción que han constituido la base de las aplicaciones analíticas desarrolladas hasta el momento [43-46]. Los efectos sobre los componentes químicos se producen cuando estos se solubilizan en la estructura supramolecular. Se establece un equilibrio de distribución entre la fase líquida o sólida en la que se encontraban y la fase supramolecular. Este equilibrio constituye el fundamento del uso de los sistemas supramoleculares en procesos de extracción y en técnicas de separación. Para el tratamiento cuantitativo de la solubilización, el sistema supramolecular se considera una pseudofase y los equilibrios de distribución se definen mediante coeficientes de reparto o constantes de equilibrio.

La solubilización de componentes químicos en la fase supramolecular tiene como efecto directo el confinamiento de los mismos en un pequeño volumen, lo que se traduce en un aumento de su concentración local. Este efecto de concentración es básico en catálisis supramolecular, área en la que la mayoría de los estudios físico-químico realizados han demostrado que una gran fracción del aumento de la velocidad de reacciones bimoleculares se debe exclusivamente a efectos de concentración.

Los distintos *microambientes* de polaridad, acidez y viscosidad en los que se localizan los componentes químicos en un sistema supramolecular, originan una serie de efectos de gran interés desde el punto de vista analítico. Los sistemas supramoleculares modifican los rendimientos cuánticos de las especies químicas produciendo sensibilización, uno de los primeros fenómenos utilizados en técnicas espectroscópicas moleculares. También originan desplazamientos batocrómicos, dando lugar a aumentos de selectividad y, ofrecen la posibilidad de realizar las medidas de fosforescencia a temperatura ambiente, ya que protegen la desactivación del estado triplete. Además, la adición de agregados moleculares a las muestras líquidas puede originar cambios en propiedades físicas como la densidad, viscosidad y tensión superficial. Este efecto se ha utilizado en espectroscopía atómica para mejorar el transporte de la muestra hasta el atomizador [44,47]. Un aspecto muy importante es la modificación que los sistemas supramoleculares ejercen en la reactividad de los sistemas químicos, modificando velocidades de reacción y alterando la distribución de productos. Estos efectos se han

aprovechado para la discriminación temporal de compuestos en el ámbito de los métodos cinéticos de análisis y en catálisis.

Además de los anteriores efectos, la interacción del sistema supramolecular con componentes químicos produce modificaciones en los parámetros de agregación del sistema supramolecular. Nuestro grupo de investigación ha utilizado estas modificaciones para desarrollar metodologías analíticas para la determinación de índices globales y parámetros de calidad de productos procesados [45] basadas en nuevos principios de medida.

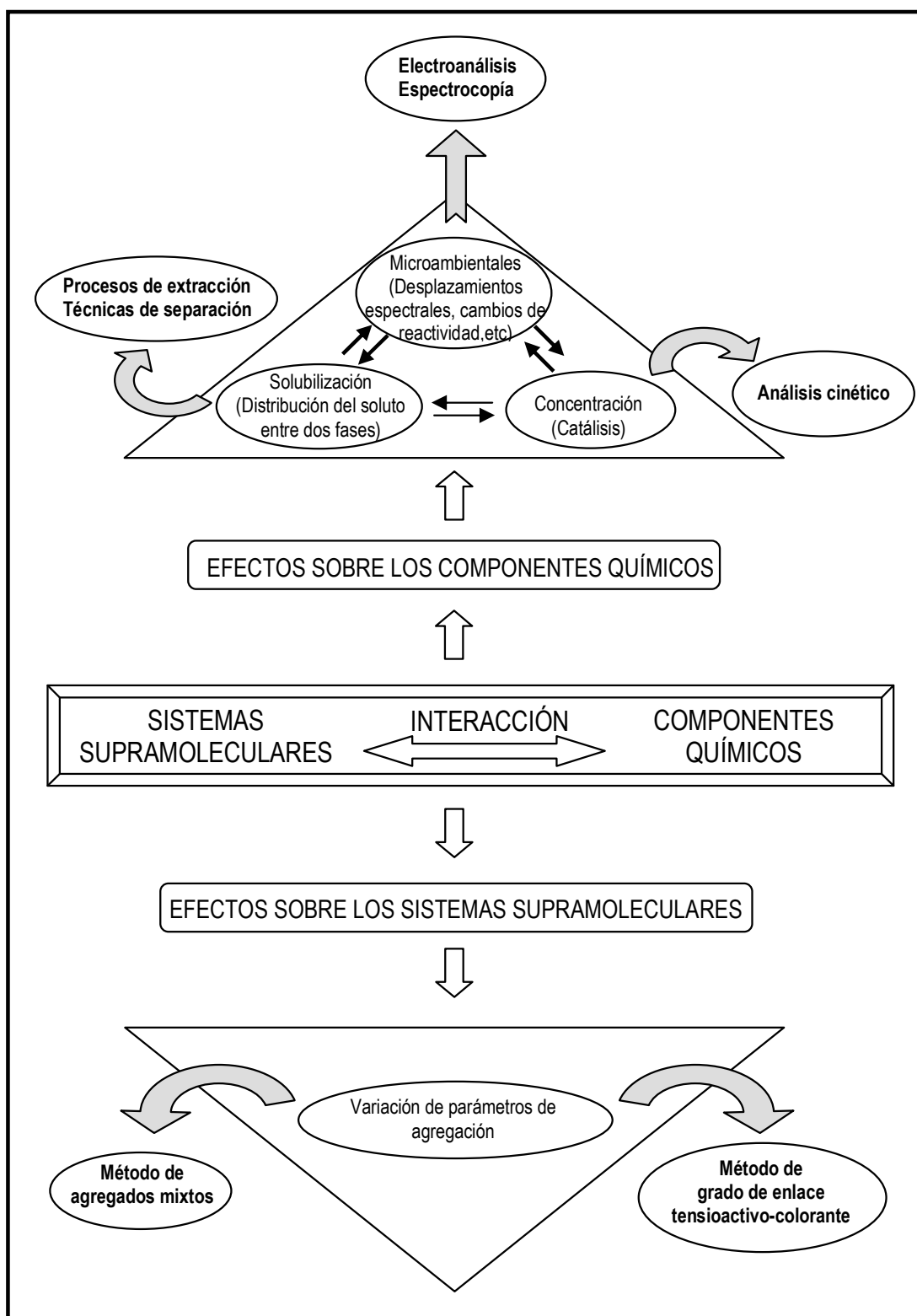


Figura 4. Efectos de la interacción entre los sistemas supramoleculares y los componentes químicos y aplicaciones analíticas derivadas.

2.4. Desarrollos en Química Analítica basados en el uso de sistemas supramoleculares

Los efectos de solubilización, concentración y microambientales que los sistemas supramoleculares ejercen sobre los componentes químicos se han utilizado en muchas áreas del análisis químico para desarrollar metodologías que superan a las que no hacen uso de estos sistemas en sensibilidad, selectividad y rapidez, o facilitando su aplicación en el laboratorio. Además, los efectos que determinadas sustancias ejercen sobre los parámetros de agregación moleculares se han utilizado para el desarrollo de nuevos principios de medida que han permitido abordar problemáticas no resueltas por métodos convencionales. A continuación se realiza un breve resumen de los principales usos de los sistemas supramoleculares en el ámbito de la Química Analítica basados en los diferentes efectos que estos ejercen sobre los sistemas químicos.

a) Efectos de solubilización

La capacidad de los sistemas supramoleculares para solubilizar compuestos químicos se ha utilizado en procesos de extracción y técnicas de separación. La característica de los sistemas supramoleculares más destacable en este contexto es su versatilidad, dada la amplia variedad de analitos con los que pueden establecer diferentes tipos de interacciones. Además, permiten reducir o eliminar el uso de disolventes orgánicos, una tendencia actual que se encuentra dentro de la denominada química sostenible o química verde.

Los sistemas supramoleculares más utilizados en **procesos de extracción** han sido los agregados moleculares de tensioactivos. A continuación se repasan las principales metodologías de extracción basadas en el uso de agregados:

- Extracción con disolventes supramoleculares. Se basa en la separación de fases que experimentan las disoluciones de agregados moleculares debido a la acción de un agente coacervante (cambios en la temperatura de la disolución, el pH, adición de sales o adición de un disolvente en el que los agregados son poco solubles, etc). Una de las fases formadas, el disolvente supramolecular, está constituida por agregados moleculares, siendo la concentración de tensioactivo en esta fase elevada y su volumen bajo. La segunda fase es una disolución diluida de tensioactivo. Los analitos se

solubilizan en los agregados que constituyen el disolvente supramolecular, el cual, al ser inmiscible con la disolución en la que se originó, se separa de ésta, produciéndose la extracción y preconcentración de los analitos. Los procesos de extracción líquido-líquido y sólido-líquido basados en la coacervación de disoluciones de tensioactivos no iónicos originada por un aumento de la temperatura, han sido prácticamente los únicos usados durante años. Esta metodología, denominada de punto de nube (*CPE*, “*cloud-point extraction*”) se ha utilizado fundamentalmente para la extracción de sustancias apolares de muestras ambientales [45, 48-52] y metales de diferentes tipos de muestras (alimentos, suelos, aguas naturales y residuales, etc) [53, 54]. En los últimos años, se han descrito nuevos procesos de coacervación y se han abordado nuevas aplicaciones que amplían de forma sustancial las prestaciones y las áreas de aplicación de estos extractantes. En la introducción de la Parte II de esta memoria se describe de forma más exhaustiva esta técnica de extracción.

- Extracción con hemimicelas y admicelas. Estos agregados moleculares se han utilizado durante cierto tiempo exclusivamente para la extracción en fase sólida de metales pesados de muestras acuosas. La extracción del metal se puede producir mediante la formación de un complejo con un ligando previamente adsolubilizado en las hemimicelas o admicelas [55-57], o mediante la formación del complejo en la disolución acuosa como paso previo a la adsolubilización [58]. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha demostrado las excelentes prestaciones de estos agregados para la extracción en fase sólida (*SPE*, “*solid phase extraction*”) de contaminantes orgánicos en muestras acuosas medioambientales [59,60]. En la introducción de la Parte III de esta Memoria se realiza una descripción pormenorizada de aspectos teóricos y prácticos de la *SPE* supramolecular.

- Ultrafiltración micelar (*MEUF*, “*micellar-enhanced ultrafiltration*”). Los analitos se solubilizan en agregados moleculares adicionados a la muestra que se separan de esta mediante ultrafiltración a través de una membrana con un tamaño de poro adecuado. Esta técnica de separación ha sido ampliamente utilizada para la eliminación de contaminantes de aguas, sobre todo metales [44,51,52,61,62] y, en menor medida, disolventes [63] y contaminantes orgánicos como fenoles y colorantes [64,65].

- Extracción con micelas inversas (“*reverse micellar extraction*”). Se trata de una extracción líquido-líquido en la que la fase orgánica contiene micelas inversas. Esta

metodología se ha empleado para la separación de biomoléculas, principalmente proteínas [66].

Los sistemas supramoleculares, tanto agregados moleculares como supermoleculas, también se han utilizado en **técnicas de separación**, como la cromatografía de gases (CG), la cromatografía de líquidos (CL) y la electroforesis capilar (EC).

- En CG, la aplicación de mayor interés es el uso de ciclodextrinas derivadas para la resolución de mezclas de enantiómeros. Se usan en la fase estacionaria como un líquido “compactado”, disueltas en una matriz aquiral o enlazadas químicamente a los grupos silanoles de la columna. Se han desarrollado numerosas aplicaciones entre las que cabe destacar el análisis de aceites esenciales y fragancias, bebidas alcohólicas, terpenos, feromonas, plaguicidas organoclorados, alquil nitratos y compuestos farmacéuticos volátiles.
- En CL se han usado agregados moleculares (micelas y vesículas) en la fase móvil, dando lugar a las denominadas cromatografía líquida micelar (MLC, “micelar liquid chromatography”) y cromatografía líquida vesicular (VLC, “vesicular liquid chromatography”), respectivamente. Estas técnicas permiten determinar una gran variedad de analitos gracias a las diferentes interacciones que se producen dentro de la columna cromatográfica, donde los solutos se distribuyen en tres fases: agua, micelas o vesículas y fase estacionaria. Por ejemplo, se han separado compuestos hidrófilos e hidrófobos en un mismo desarrollo cromatográfico sin necesidad de usar gradiente de elución. Además, tanto MLC como la VLC permiten la inyección directa de muestras biológicas en el sistema cromatográfico, ya que las fases móviles mantienen a las proteínas en disolución favoreciendo su elución con el frente del disolvente o a bajos tiempos de retención. Las ventajas que ofrecen la MLC y la VLC en el campo del bioanálisis han potenciado su uso en estudios de especiación y en el análisis de drogas [44, 67-70].

Las ciclodextrinas también se han usado en combinación con la CL. Estas supermoleculas se incorporan tanto a la fase móvil como a la fase estacionaria para llevar a cabo separaciones quirales. La resolución alcanzada con estos sistemas depende del tipo y concentración de ciclodextrina usada, de la naturaleza de la fase

móvil y de la fase estacionaria y de la temperatura. Esta estrategia se ha utilizado para la resolución quiral de más de 1000 compuestos [41,71,72].

- En EC también se han usado ambos tipos de sistemas supramoleculares. El uso de micelas como aditivo de la disolución reguladora en electroforesis capilar ha dado lugar a la cromatografía electrocinética micelar (MEKC). Hoy día, la MEKC es una de las modalidades más utilizadas en EC debido a su elevada capacidad de resolución, permitiendo la separación conjunta de analitos neutros y cargados. Su principal aplicación es la determinación de drogas, incluidos test de pureza y análisis de fluidos biológicos. También se han realizado interesantes aplicaciones en análisis de alimentos y medioambiente [73-76]. Por otra parte, las ciclodextrinas y sus derivados constituyen una amplia gama de selectores quirales para separaciones electroforéticas, siendo ésta un área en expansión para el análisis de muestras complejas biológicas, clínicas y medioambientales [77-83].

b) Efectos de concentración

La concentración de sustancias químicas, en la mayoría de los casos en agregados micelares, se ha usado fundamentalmente en análisis cinético. La catálisis micelar se basa en el aumento de la velocidad de reacciones químicas desarrolladas en presencia de agregados micelares. Para que dicha catálisis se produzca es necesario que al menos una de las especies reaccionantes se solubilice en el agregado. Por lo tanto, la eficacia de la catálisis micelar dependerá de la constante de enlace soluto-micela, que a su vez variará en función de la naturaleza de las moléculas de tensioactivo que forman los agregados y de la naturaleza del soluto. Por otra parte, el efecto de concentración combinado con efectos microambientales como la modificación de rendimientos cuánticos, desplazamientos espectrales, modificación de constantes termodinámicas etc., han permitido ampliar considerablemente el campo de aplicación de la catálisis micelar. Así, se han desarrollado diferentes aplicaciones para la determinación de especies inorgánicas y orgánicas [84,85] y de multicomponentes [86].

c) Efectos microambientales

La modificación del microambiente en el que se encuentran los solutos cuando se incorporan en un sistema supramolecular se ha aprovechado en Química Analítica para mejorar o posibilitar determinaciones espectroscópicas y electroquímicas.

1.- *Análisis espectroscópico.*

- Espectrofotometría UV-VIS. La solubilización de determinadas sustancias químicas en agregados moleculares puede causar la modificación de sus espectros de absorción (desplazamientos batocrómicos, hiperocrómicos, etc). Este efecto se ha utilizado para posibilitar la determinación de ciertas especies, o mejorar las características analíticas (fundamentalmente sensibilidad y selectividad) de métodos ya existentes. La formación de pares iónicos tensioactivo-analito en el propio agregado molecular también se ha utilizado para mejorar las características de determinados métodos [44,87,88].
- Técnicas luminiscentes moleculares. En esta área, los agregados moleculares han permitido aumentar la sensibilidad de las determinaciones analíticas, debido a que protegen al analito o producto de reacción, evitando los procesos de desactivación no radiante. Este efecto tiene especial interés en fosforimetría donde el uso de agregados moleculares ha permitido realizar medidas a temperatura ambiente [44,89,90].
- Quimioluminimetría. Los agregados moleculares usados en los métodos quimioluminiscentes han sido micelas y supermoleculas. Los sistemas supramoleculares modifican tanto la intensidad como la duración de la señal quimioluminiscente, lo que ha permitido mejorar las características analíticas de los métodos [44,89].

2.- *Análisis electroquímico.*

Los sistemas supramoleculares modifican las reacciones redox implicadas en Coulombimetría, Voltamperometría y Potenciometría. Entre los efectos que producen cabe destacar: (i) Estabilización de especies químicas inestables producidas en los electrodos mediante interacciones iónicas e hidrófobas con los agregados supramoleculares; (ii) Alteración del coeficiente de distribución del proceso electrodo, debido a la distribución del reactivo electroactivo y/o productos en un medio micelar; (iii) Efectos catalíticos en la transferencia electrónica, que generalmente producen un incremento de sensibilidad. Por otra parte, las técnicas electroanalíticas se han utilizado para determinar parámetros característicos de los agregados moleculares

como la concentración micelar crítica (cmc), el número de agregación, grado de disociación, etc. [91,92].

d) Métodos analíticos basados en la medida de parámetros de agregación

La influencia que determinadas sustancias químicas (analitos) ejercen sobre parámetros característicos de los agregados de compuestos anfifílicos se ha utilizado para desarrollar métodos de análisis, de especial interés en el ámbito de la determinación de índices globales y el control de calidad de productos elaborados. El primer método basado en parámetros de agregación, denominado método de agregados mixtos, fue desarrollado por nuestro grupo de investigación a mediados de los 90 [93]. El fundamento teórico y el campo de aplicación de este método ha sido perfectamente establecido y su utilidad para la determinación de compuestos anfifílicos de diferente naturaleza demostrada [94-104]. Más recientemente, se han desarrollado varios métodos basados en agregación competitiva y medidas fotométricas [105,106] o volumétricas [107]. En este último caso, el método se ha denominado método de grado de enlace tensioactivo-colorante (GETC).

En esta Tesis Doctoral se han desarrollado varias aplicaciones de la metodología GETC para el control de calidad de drogas terapéuticas en fármacos. Es de destacar la simplicidad del tratamiento de la muestra, la rapidez y el bajo coste de los métodos basados en esta metodología. En la introducción de la Parte I de esta memoria se realiza una descripción pormenorizada de los aspectos teóricos y prácticos de esta metodología.

3. SISTEMAS SUPRAMOLECULARES MIXTOS DE DROGAS Y TENSIOACTIVOS

3.1. Autoensamblaje de drogas: comportamiento en disolución

Como ya hemos comentado anteriormente, la mayoría de las drogas terapéuticas usadas con fines terapéuticos son anfifílicas (poseen regiones hidrófilas e hidrófobas en su estructura molecular). La región hidrófoba de la droga puede estar constituida por cadenas hidrocarbonadas, anillos hidrocarbonados saturados y anillos aromáticos, y la parte hidrófila por grupos polares de diferente naturaleza (grupos carboxílicos, amino, de amonio cuaternario, etc).

Son compuestos anfifílicos numerosos antibióticos del grupo de las penicilinas, cefalosporinas, sulfonamidas, tetraciclinas, macrólidos, fluoroquinolonas, etc, antihistamínicos, antidepresivos tricíclicos, fenotiazinas, antiinflamatorios del grupo de los ácidos fenámicos, propiónicos, etc, corticoides y drogas terapéuticas usadas en los tratamientos oncológicos. El carácter anfifílico de las drogas facilita su penetración en las células y favorece su interacción con los centros receptores.

Las drogas terapéuticas, al igual que otros compuestos anfifílicos (ej. tensioactivos), forman agregados de dimensiones coloidales y estructura bien definida, tanto en disolución acuosa como en medios apolares. Así, por ejemplo, fenotiazinas como la clorpromazina, promazina, prometazina y tioridazina forman micelas en disolución acuosa con un número de agregación de 10 y geometría aproximadamente esférica mediante un proceso de apilamiento vertical ("stacking") de los monómeros de droga [108] (Figura 5). También se ha descrito la formación de micelas de antidepresivos tricíclicos [109-111], penicilinas [112,113], antiinflamatorios no esteroideos [114], antihistamínicos, β -bloqueantes y otras drogas anfifílicas [115]. En la Tabla 6 se muestra la concentración micelar crítica para drogas pertenecientes a diferentes grupos terapéuticos.

En general la cmc de las drogas es muy superior a la de los tensioactivos de la misma naturaleza (iónicos o no iónicos), pero en determinados aspectos los agregados de drogas se comportan de forma similar a los agregados de tensioactivos. Así, los cambios que experimentan determinadas drogas como imipramina, clomipramina [109], cloxacilina, dicloxacilina [112] y penicilina V [113] con la temperatura son similares a los

que experimenta la cmc de tensioactivos; disminuye al aumentar la temperatura hasta alcanzar un mínimo a 25 °C, y aumenta con nuevos incrementos en la temperatura por encima de este valor. La cmc de otras drogas como la butriptilina, aumenta ligeramente a medida que aumenta la temperatura de la disolución entre 10 y 40 °C [111].

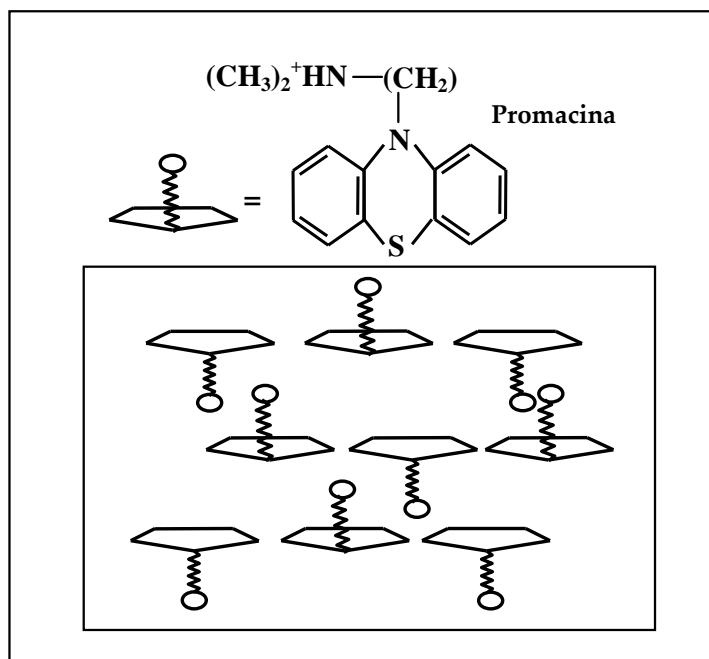


Figura 5. Apilamiento vertical de monómeros de promacina que da lugar a la formación de micelas.

3.2. Agregados mixtos de drogas y tensioactivos: comportamiento y estructuras

Las mezclas acuosas de droga anfifílica y tensioactivo se comportan de forma similar a las mezclas de tensioactivos. Las drogas y los tensioactivos de la misma naturaleza generalmente forman micelas mixtas. Por ejemplo, se ha descrito la formación de micelas mixtas del tensioactivo catiónico bromuro de dodeciltrimetilamonio (BrDTA) y amitriptilina (droga catiónica) [116]. Sin embargo, la adición de un tensioactivo iónico a una disolución de droga con carga opuesta puede dar lugar tanto a la formación de micelas como de vesículas mixtas, dependiendo de la estructura molecular, la fracción molar y la concentración total de ambos compuestos anfifílicos en disolución. Así, el tensioactivo catiónico bromuro de tetradeciltrimetilamonio (BrTTA) y el tensioactivo aniónico SDS forman micelas mixtas con la droga aniónica ibuprofeno y la droga

catiónica lidocaína, respectivamente, independientemente de la fracción molar de droga y tensioactivo en disolución [117]. Sin embargo, con otras drogas catiónicas como la orfenadrina [117], imipramina, difenhidramina y tetracaína [118], el SDS forma vesículas o micelas, dependiendo de la fracción molar del SDS en la disolución y la concentración total [SDS]+[droga]. Finalmente, los ácidos dodecanóico y decanóico forman vesículas con numerosas drogas catiónicas: aprenolol, amitriptilina, difenhidramina, lidocaína, orfenadrina, propranolol y tetracaína, a fracciones molares de biotensioactivo que varían en función del ácido alquilcarboxílico y la droga de que se trate, siendo estos valores siempre superiores a 0,4 [115].

Tabla 6. Concentración micelar crítica (cmc) de diferentes drogas terapéuticas en disolución acuosa a 25°C

DROGA	cmc (mM)	DROGA	cmc (mM)
Antidepresivos tricíclicos		Antiinflamatorios	
Impramine	51 ^a	Ibuprofeno	180 ^f
Clomipramina	23 ^a	Antihistamínicos	
Amitriptilina	25 ^b	Difenhidrina	122 ^g
Nortriptilina	20 ^b	β-bloqueantes	
Desipramina	35 ^b	Propranolol	124 ^g
Doxepina	69 ^c	Alprenolol	100 ^g
Butriptilina	49 ^c	Anestésicos locales	
Antibióticos		Lidocaína	195 ^g
Cloxacilina	93 ^d	Tetracaína	38 ^g
Dicloxacilina	86 ^d	Relajantes musculares	
Penicilina V	40 ^e	Orfenadrina	10 ^g

Referencias: ^a[109], ^b[110], ^c[111], ^d[112], ^e[113], ^f[114], ^g[115]

La concentración crítica de agregación (cca) para mezclas de tensioactivos y drogas de igual [116] o diferente [95-97] naturaleza (C^*), varía en función de la fracción molar de cada uno de ellos en disolución (α_i) de acuerdo con la expresión matemática:

$$\frac{1}{C^*} = \sum_{i=1}^n \frac{\alpha_i}{f_i C_i} \quad [1]$$

donde C_i es la cca del compuesto anfífilo “ i ” y f_i es el factor de actividad, un parámetro que expresa la contribución de las interacciones entre las moléculas de tensioactivo y droga dentro del agregado. Aplicando el modelo de disolución regular a una mezcla binaria de compuestos anfífilos [119]:

$$f_1 = e^{\delta x_2^2} \quad [2]$$

$$f_2 = e^{\delta x_1^2} \quad [3]$$

En estas expresiones, x_1 y x_2 son las fracciones molares de los compuestos anfífilos 1 y 2 en el agregado mixto y δ es un parámetro adimensional que representa la diferencia entre las interacciones que se producen entre las moléculas de los compuestos anfífilos en los agregados simples y mixtos. Este parámetro viene dado por:

$$\delta = \frac{N (W_{11} + W_{22} - 2W_{12})}{RT} \quad [4]$$

donde N es el número de Avogadro, W_{11} y W_{22} , las energías de interacción entre moléculas de compuestos anfífilos en los agregados formados por un único compuesto y W_{12} la energía de interacción entre los anfífilos 1 y 2 en el agregado mixto.

Uno de los factores que más influyen en el valor de δ obtenido para un determinado agregado mixto es la naturaleza de los compuestos anfífilos que constituyen dicho agregado. Así, en el caso de micelas mixtas, el valor de δ se aproxima a cero y los factores de actividad se aproximan a 1 para mezclas de anfífilos con grupos hidrófilos de la misma naturaleza (por ejemplo no iónico-no iónico). Sin embargo, para mezclas de anfífilos con grupos hidrófilos de diferente naturaleza, el valor de δ es inferior a cero y los factores de actividad inferiores a 1. Las interacciones más fuertes se producen cuando el tensioactivo y la droga que forman el agregado mixto tienen carga opuesta, produciéndose importantes disminuciones de la cca del agregado mixto con respecto a la de los agregados simples. Este es el caso de los agregados mixtos formados por SDS con fenotiacinas [95], antihistaminas [96] y antidepresivos tricíclicos [97]. En la Figura 6 se muestra la variación de la cca para la formación de agregados mixtos de SDS y prometacina, promacina, clorpromazina o tioridacina en función de la fracción molar de droga en la disolución acuosa.

Otros factores que afectan al valor de δ obtenido son: (a) la longitud de la cadena hidrocarbonada de los compuestos anfífilos que forman el agregado; un aumento en la

longitud de la cadena hidrocarbonada de ambos anfífilos da lugar a valores del parámetro δ más negativos y (b) la fuerza iónica y la temperatura que ejercen su efecto en la formación de agregados mixtos disminuyendo la energía de interacción entre moléculas de anfífilo de diferente naturaleza causando un aumento del valor de δ y por lo tanto, del valor de C^* .

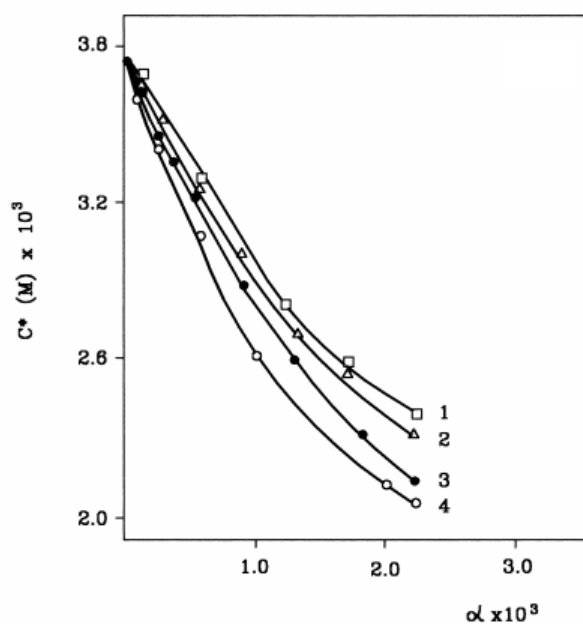


Figura 6. Variación de la cca de agregados mixtos de SDS y diferentes fenotiazinas: (1) prometazina, (2) promazina, (3) clorpromazina y (4) tioridazina, en función de la fracción molar de fenotiazina.

4. BIBLIOGRAFÍA

- [1] IMS Health Reports Global, Global Pharmaceutical Sales 2001-2008, 2008 (www.imshealth.com/deployedfiles/imshealth/Global/Content/StaticFile/Top_Line_Data/Global_Pharma_Sales_2001-2008_Version_2.pdf).
- [2] IMS Health Reports Global, Global Pharmaceutical Sales 2000-2007, 2007 (www.imshealth.com/deployedfiles/imshealth/Global/Content/StaticFile/Top_Line_Data/GlobalSales.pdf).
- [3] Boletín de Coyuntura nº 46 Febrero 2009.
- [4] Uso de antiinflamatorios no esteroides en España (www.agemed.es/profHumana/observatorio/docs/utilizacionAINE-feb08.pdf).
- [5] Uso de antibióticos en España (www.agemed.es/profHumana/observatorio/docs/us-o-antibioticos-oct07.pdf).
- [6] Nota descriptiva N° 293, 2005 (www.who.int/mediacentre/factsheets/fs293/es/index.html).
- [7] Reglamento (CEE) nº 2377/90 del Consejo, de 26 de junio de 1990, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. DO L 224 de 18.8.1990, p.1/8.
- [8] Directiva 96/22/CE del Consejo, de 29 de abril de 1996, por la que se prohíbe utilizar determinadas sustancias de efecto hormonal y tireostático y sustancias β -agonistas en la cría de ganado y por la que se derogan las Directivas 81/602/CEE, 88/146/CEE y 88/299/CEE. DO L 125 de 23.5.1996, p. 3/9.
- [9] Directiva 96/23/CE del Consejo, de 29 de abril de 1996, relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y por la que se derogan las Directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las Decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE. DO L 125 de 23.5.1996, p. 10/32.
- [10] 2002/657/EC: Decisión de la Comisión, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/EC del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. DO L 221 de 17.8.2002, p. 8/36.
- [11] The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). Annual Report 2006.
- [12] V. Andreu, C. Blasco, Y. Picó, Trends Anal. Chem. 26 (2007) 534.
- [13] K. Fent, A.A. Weston, D. Caminada, Aquatic Toxicol. 76 (2006) 122.
- [14] P.K. Hansen, B.T. Lunestad, O.B. Samuelsen, Can. J. Microbiol. 39 (1999) 1307.

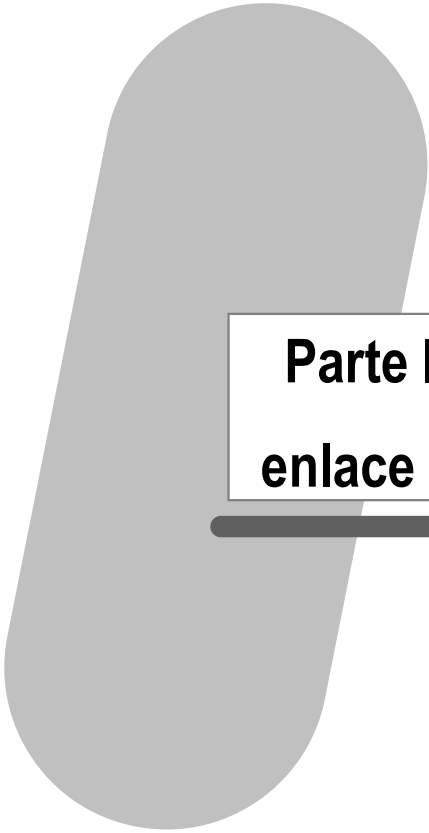
-
- [15] J.V. Pothuluri, M. Nawaz, C.E. Cerniglia, *Bioremediation* 2 (1998) 221.
- [16] L.Pursell, T. Dineen, J. Kerry, S. Vaughan, P. Smith, *Aquaculture* 145 (1996) 21.
- [17] L. Migliore, G. Brambilla, P. Casoria, D. Civitareale, S. Cozzolino, L. Gaudio, *Fresenius' Environ. Bull* 5 (1996) 735.
- [18] R.P. Herwing, J.P. Gray, *Aquaculture* 152 (1997) 139.
- [19] K. Nygaard, B.T. Lunestad, H. Hektoen, J.A. Berge, V. Hormazabal, *Aquaculture* 104 (1992) 31.
- [20] S.D. Richardson, *Anal. Chem.* 79 (2007) 4295.
- [21] Directiva 98/83/CE del Consejo, de 3 de noviembre de 1998, relativa a la calidad de aguas destinadas al consumo humano. DO L 330 de 5.12.1998, p. 32/54.
- [22] EPA (2002) 2002 edition of the drinking water standards and health advisories, United States Environmental Protection Agency, office of water, Washington DC, USA (EPA822-R-02-038) (<http://www.epa.gov/waterscience/drinking/standards/dwstandards.pdf>).
- [23] IMS Health. Intelligence. 2005. Report N° 360.
- [24] M. Farré, I. Ferrer, A. Ginebreda, M. Figueras, L. Olivilla, L. Tirapu, M. Vilanova, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 187.
- [25] M. Gros, M. Petrović, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 941.
- [26] S. F. Webb, Springer-Verlag, Berlin, 2001, pp. 319-343.
- [27] B. Ferrari, R. Mons, B. Vollat, B. Fraysse, N. Paxeus, R. Lo Giudice, A. Pollio, J. Garric, *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (2004) 1344.
- [28] M. Cleuvers, *Toxicol. Lett.* 142 (2003) 185.
- [29] M. Cleuvers, *Chemosphere* 58 (2004) 199.
- [30] M. Isidori, M. Lavorgna, A. Nardelli, A. Parrella, L. Previtiera, M. Rubino, *Sci. Total Environ.* 348 (2005) 93.
- [31] Reglamento (CE) N° 1181/2002 de la Comisión, de 1 de julio de 2002, por el que se modifica el anexo I del Reglamento (CEE) N° 2377/90 del Consejo por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. DO L 172 de 2.7.2002, p. 13/20.
- [32] Reglamento (CE) N° 1356/2005 de la Comisión, de 18 de agosto de 2005, que modifica en lo referente al ácido oxolínico y al morantel, el anexo I del Reglamento (CEE) N° 2377/90 del Consejo, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. DO L 214 de 19.8.2005, p. 3/5.

- [33] Reglamento (CEE) N° 675/92 de la Comisión, de 18 de marzo de 1992, por el que se modifican los Anexos I y II del Reglamento (CEE) N° 2377/90 del Consejo que establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. DO L 73 de 19.3.1992, p. 8/14.
- [34] J.M. Lehn, *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives. A Personal Account*, John Wiley & Son, New York, 1995.
- [35] J.M. Lehn in: *Supramolecular Chemistry: Where it is and where it is going*, R. Ungaro, E. Dalcanale (Eds.), Kluwe, Dordrecht (1999) pp. 287-304.
- [36] J.W. Steed, J.L. Atwood, *Supramolecular Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, 2000.
- [37] J.L. Atwood, J.M. Lehn, J.E.D. Davies, D.D. MacNicol, F. Vogtle (Eds.), *Comprehensive Supramolecular Chemistry: 11-Volume Set*, Pergamon Press, 1996.
- [38] J.L. Atwood, J.W. Steed (Eds.), *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*, Marcel Dekker, New York 2004.
- [39] J.M. Lehn, *Chem. Eur. J.*, 6 (2000) 2097.
- [40] J.L. Sessler (Ed.), *Journal: Supramolecular Chemistry*, Taylor & Francis group, ISSN 1061-0278.
- [41] J.H. Fendler, *Membrane Mimetic Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, 1982.
- [42] J.H. Fuhrhop, J. Koning, *Membranes and Molecular Assemblies: The Synkinetic Approach*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1994.
- [43] J.F. Scamehorn, J.H. Harwell (Eds.), *Surfactant-Based Separation Processes*, Marcel Dekker, New York, 1989.
- [44] E. Pramauro, E. Pelizzetti, *Surfactants in Analytical Chemistry. Applications of Organized Amphiphilic Media*, Elsevier, New York, 1996.
- [45] S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Trends Anal. Chem.*, 22 (2003) 470.
- [46] M.G. Khaledi, *Trends Anal. Chem.* 7 (1988) 293.
- [47] A. Sanz-Medel, M.R. Fernandez, E. Blanco, M.L. Fernández-Sánchez, *Spectrochim. Acta B*, 54 (1999) 251.
- [48] Z. Sosa Ferrera, C. Padron Sanz, C. Mahugo Santana, J.J. Santana Rodriguez, *Trends Anal. Chem.*, 23 (2004) 469.
- [49] R. Carabias-Martinez, E. Rodriguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero; J.L. Perez-Pavon, E. Fernandez-Laespada, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 251.
- [50] R. Halko, M. Hutta, *Chemicke Listy*, 94 (2000) 990.

-
- [51] E. Pramauro, A.B. Prevot, *Recent Res. Develop. in Pure & Appl. Anal. Chem.*, 1 (1998) 225.
- [52] E. Pramauro, A.B. Prevot, *Pure and Appl. Chem.*, 67 (1995) 551.
- [53] M. Bezerra, M.A. Arruda, S.L. Ferreira, *Applied Spectrosc. Reviews*, 40 (2005) 269.
- [54] C.D. Stalikas, *Trends Anal. Chem.*, 21 (2002) 343.
- [55] M. Hiraide, J. Iwasawa, H. Kawaguchi, *Talanta* 44 (1997) 231.
- [56] J.L. Manzoori, M.H. Sorouraddin, A.M.H. Shabani, *J. Anal. Atomic Spectrometry* 13 (1998) 305.
- [57] J.L. Manzoori, M.H. Sorouraddin, A.M.H. Shabani, *Microchem. J.* 63 (1999) 295.
- [58] M. Hiraide, Hori, *J. Anal. Sci.* 15 (1999) 1055.
- [59] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6799.
- [60] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 76 (2004) 3878.
- [61] E. Pramauro, A.B. Prevot, *Chimica e l'Industria*, 80 (1998) 733.
- [62] R.O. Dunn, J.F. Scamehorn, S.D. Christian, *Sep. Sci. Technol.*, 20 (1985) 257.
- [63] S.D. Christian, J.F. Scamehorn, *Surfactant Science Series*, 33(Surfactant-Bases Sep. Processes) (1989) 3.
- [64] M. Bielska, J. Szymanowski, *Water Research*, 40 (2006) 2027.
- [65] M.C. Figueroa, E.M. Weber, *Sep. Sci. Tech.*, 40 (2005) 1653.
- [66] S.H. Krishna, N.D. Srinivas. K.S. Raghavarao, N.G. Karanth, *Adv. Biochem. Eng./Biotech.* 75 (2002) 119.
- [67] M.C. García Alvarez-Coque, S. Carda, *J. Chromatogr. B.*, 736 (1999) 1.
- [68] S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 834.
- [69] S. Terabe, K. Otsuka, D. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 111.
- [70] C.A. Ponce de León, M. Montes-Bayón, J.A. Caruso, *J. Chromatogr. A.*, 974 (2002) 1.
- [71] C.R. Mitchell, D.W. Armstrong, *Chiral Separations*, G. Gübitz, M.G. Schmid (Eds.), Humana Press, Totowa, USA, 2003, pp. 61-112.
- [72] M. Waksmundzka-Hajnos, *J. Chromatogr. B.* 717 (1998) 93.
- [73] J. Vindevogel, P. Sandra, *Introduction to Micellar Electrokinetic Chrom.*, Hüthig, Heidelberg, 1992.
- [74] M.G. Khaledi, *J. Chromatogr. A.*, 780 (1997) 3.
- [75] P.G. Muijselaar, K. Otsuka, S. Terabe, *J. Chromatogr. A.*, 780 (1997) 41.
- [76] J.P. Quirino, S. Terabe, *J. Chromatogr. A.*, 856 (1999) 465.

- [77] H. Wan, L.G. Blomberg, *J. Chromatogr. A.*, 875 (2000) 43.
- [78] B. Chankvetadze, *J. Chromatogr. A.*, 792 (1997) 269.
- [79] G. Gübitz, M.G. Schmid, *J. Chromatogr. A.*, 792 (1997) 179.
- [80] B. Chankvetadze, *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, Wiley, Chichester, 1997.
- [81] B. Chankvetadze, *Trends Anal. Chem.*, 18 (1999) 485.
- [82] K. Otseka, S. Terabe, *J. Chromatogr. A.*, 875 (2000) 163.
- [83] R. Kuhn, *Electrophoresis*, 20 (1999) 2605.
- [84] L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta*, 268 (1992) 145.
- [85] D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Talanta*, 38 (1991) 1147.
- [86] V. González, B. Moreno Cordero, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 1897.
- [87] W.L. Hinze, in: K.L. Mittal (Ed.), *Solution Chemistry of Surfactants*. Plenum Press, New York, 1979, pp 79-127.
- [88] E. Pelizzetti, E. Pramauro, *Anal. Chim. Acta*, 169 (1985) 1.
- [89] W.L. Hinze, N. Srinivasan, T.K. Smith, S. Igarashi and H. Hohino, in: *Advances in Multidimensional Luminiscence*. JAI Pres, Tokyo, 1991, Vol. 1, pp. 149-206.
- [90] M.E. Diaz Garcia, A. Sanz-Medel, *Anal. Chem.*, 58 (1986) 1436.
- [91] G.L. McIntire, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 21 (1990) 257.
- [92] R.A. Mackay, J. Texter (Eds.), *Electrochemistry in Colloids and Dispersions*, VCH, New York, 1992.
- [93] D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 1872.
- [94] I. Casero, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Talanta*, 45 (1997) 167.
- [95] E. Borrego, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta*, 362 (1998) 285.
- [96] M. P. San Andrés, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Analyst.*, 123 (1998) 1079.
- [97] M. P. San Andrés, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Pharm. Sci.*, 87 (1998) 821.
- [98] E. Borrego, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta*, 384 (1999) 175.
- [99] E. Borrego, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Trends Anal. Chem.*, 20 (2001) 241.

-
- [100] I. Casero, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta*, 345 (1997) 75.
- [101] E. Borrego, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta*, 384 (1999) 105.
- [102] E. Borrego, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 75 (1999) 181.
- [103] E. Borrego, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. AOAC Int.*, 85 (2002) 173.
- [104] E. Borrego, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Analyst*, 125 (2000) 1507.
- [105] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Analyst*, 126 (2001) 126.
- [106] M. Amjadi, J.L. Manzoori, L. Farzampour, *Spectroscopy*, 22 (2008) 309.
- [107] R. Fabios, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito. *Anal. Chem.*, 75 (2003) 6011.
- [108] D. Attwood, V. Mosquera, L. Novas, F. Sarmiento, *J. Colloid Inter. Sci.*, 179 (1996) 478.
- [109] D. Attwood, V. Mosquera, M. García, M.J. Suárez, F. Sarmiento, *J. Colloid Inter. Sci.*, 175 (1995) 201.
- [110] P. Taboada, J.M. Ruso, M. García, V. Mosquera, *Colloids Surf. A*, 179 (2001) 125.
- [111] P. Taboada, P. Martínez-Landeira, J. M. Ruso, M. García, V. Mosquera, *Colloids Surf. A*, 197 (2002) 95.
- [112] P. Taboada, D. Attwood, M. García, M. N. Jones, J. M. Ruso, V. Mosquera, F. Sarmiento, *J. Colloid Inter. Sci.*, 221 (2000) 242.
- [113] P. Taboada, M. Pérez-Rodríguez, L.M. Varela, S. Barbosa, M. García, V. Mosquera, *Thermochim. Acta*, 394 (2002) 39.
- [114] A. Ridell, H. Evertsson, S. Nilsson, L. O. Sundelöf, *J. Pharm. Sci.*, 88 (1999) 1175.
- [115] N. Dew, T. Bramer, K. Edsman, *J. Colloid Interface Sci.*, 323 (2008) 386.
- [116] A. Rodríguez, E. Junquera, P. del Burgo, E. Aicart, *J. Colloid Interface Sci.*, 269 (2004) 476.
- [117] T. Bramer, N. Drew, K. Edsman, *J. Pharm. Sci.*, 95 (2006) 769.
- [118] T. Bramer, M. Paulsson, K. Edwards, K. Edsman, *Pharm. Res.*, 20 (2003) 1661.
- [119] P. M. Hollan en "Mixed Surfactants Systems", Eds. P.M. Holland, D.N. Rubingh, ACS Symposium Series 501, American Chemical Society, Washintong DC, 1992, capítulo 2.



**Parte I. Método de grado de
enlace tensioactivo-colorante**

1. OBJETO

El control de la calidad de los fármacos es fundamental para garantizar que el contenido en principios activos de los preparados farmacéuticos es el especificado, asegurando de esta forma su eficacia e inocuidad. Este control supone la realización de un elevado número de análisis que proporcionen resultados de calidad en el menor tiempo posible y con un bajo coste.

Los métodos basados en la medida de parámetros de agregación son métodos diseñados para la determinación de compuestos anfifílicos, como es el caso de la mayoría de las drogas usadas con fines terapéuticos. Estos métodos presentan características especialmente adecuadas para su aplicación al análisis de rutina:

- 1) Versatilidad, ya que se basan en una propiedad general de los compuestos anfifílicos, su capacidad para formar agregados mixtos.
- 2) Exactitud y precisión.
- 3) Simplicidad. Las medidas se basan en procesos de valoración con detección instrumental del punto final.
- 4) Rapidez. Las curvas de valoración se obtienen en unos pocos minutos.
- 5) Bajo coste de la instrumentación y de los reactivos usados.

Las investigaciones desarrolladas en la primera parte de esta Tesis Doctoral han tenido como objetivo ampliar el campo de aplicación de una metodología basada en parámetros de agregación, la metodología de grado de enlace tensioactivo-colorante (GETC), a la determinación de principios activos con estructuras químicas no ensayadas hasta el momento, concretamente, compuestos con estructuras esteroideas y compuestos catiónicos. Esta metodología se basa en procesos de agregación competitiva en mezclas ternarias de compuestos anfifílicos constituidas por un tensioactivo iónico, un colorante con carga opuesta a la de dicho tensioactivo y el propio analito.

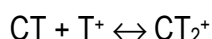
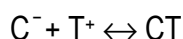
A continuación se expone el fundamento teórico que ha servido de base para desarrollar la función de calibración utilizada en la metodología de grado de enlace tensioactivo-colorante, el procedimiento operacional usado para su implementación en el laboratorio y otros aspectos relevantes de la metodología, para finalmente exponer los

principales resultados obtenidos en las investigaciones realizadas sobre esta temática en esta Tesis Doctoral.

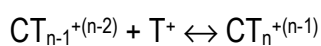
2. METODOLOGÍA DE GRADO DE ENLACE TENSOACTIVO-COLORANTE

2.1. Fundamento teórico

La adición de un tensioactivo iónico a una disolución de un colorante anfifílico con carga opuesta da lugar a la formación de agregados mixtos colorante-tensioactivo. De acuerdo con la formulación de Simončič y col. [1-3], el proceso de agregación responde a un modelo mononuclear, en el que el colorante es el elemento central con el que interaccionan moléculas de tensioactivo para formar agregados de diferente estequiometría a medida que aumenta la concentración de tensioactivo en disolución. Para un colorante aniónico (C^-) y un tensioactivo catiónico T^+ :



.....



El grado de enlace tensioactivo-colorante, β_C , parámetro que representa el número de moléculas de tensioactivo enlazadas a cada molécula de colorante en el agregado mixto, viene dado por:

$$\beta_C = \frac{m_T - m_{T,M}}{m_C} \quad (1)$$

donde m_T es la concentración total de tensioactivo, $m_{T,M}$ la concentración de tensioactivo en forma monomérica y m_C la concentración total de colorante.

La adición de un compuesto anfifílico a disoluciones de tensioactivo iónico y colorante originará una disminución del grado de enlace tensioactivo-colorante debido a la competencia que se establece entre el colorante y la sustancia química adicionada para interaccionar con el tensioactivo [1, 3, 4-6]. En presencia de dicha sustancia química, el grado de enlace tensioactivo-colorante, β_C , viene dado por [1]:

$$\beta_C = \frac{m_T - m_{T,M} - \beta_S m_S}{m_C} \quad (2)$$

donde m_T , $m_{T,M}$ y m_C tienen el mismo significado que en la ec. (1), m_S es la concentración de sustancia química adicionada a la disolución acuosa y β_S es el grado de enlace tensioactivo-sustancia química.

La diferencia entre el valor de β_C obtenido para una determinada concentración de tensioactivo y colorante en presencia y ausencia de la sustancia química varía en función de β_S y m_S [comparar la ec. (1) con la ec. (2)].

Considerando que la sustancia química que origina la disminución del grado de enlace entre el tensioactivo, usado como reactivo, y el colorante es el analito cuya concentración se desea determinar y basándonos en la ec. (2), el valor de β_C en presencia de dicho analito vendrá dado por:

$$\beta_C = \frac{m_T^* - m_{T,M} - \beta_A m_A}{m_C} \quad (3)$$

donde m_T^* es la cantidad de tensioactivo reactivo necesaria para alcanzar el mismo grado de enlace en presencia y ausencia de analito, β_A el grado de enlace tensioactivo-analito y m_A la concentración de analito.

Asumiendo que la concentración de tensioactivo reactivo en forma monomérica ($m_{T,M}$) no depende de la concentración de analito presente en la disolución acuosa, las ec. (1) y (3) pueden combinarse para obtener:

$$m_T^* - m_T = \beta_A m_A \quad (4)$$

La curva de calibrado se construye representando el parámetro $m_T^* - m_T$ frente a m_A . El intervalo de linealidad para la determinación del analito se corresponde con concentraciones del mismo a las que β_A se mantiene constante.

2.2. Procedimiento operacional

Los parámetros m_T^* y m_T se obtienen mediante valoración usando el tensioactivo reactivo como valorante y midiendo los cambios de absorbancia del colorante debidos a la formación de agregados mixtos tensioactivo reactivo-colorante. El sistema de medida utilizado, un valorador 794 Basic Titrimo de Metrohm, se muestra en la Figura 1.

En el vaso de valoración se coloca una disolución acuosa que contiene el colorante y la muestra con el analito o analitos a determinar y en ella, se introduce la sonda fotométrica que permitirá medir los cambios de absorbancia del colorante a medida que desde la bureta automática, se adicione el tensioactivo valorante. La disolución se agita de forma continua para su homogenización. Los valores de absorbancia medidos a una longitud de onda adecuada en función del volumen de valorante añadido son tomados y tratados por un sistema informático. Este sistema consiste en un ordenador personal equipado con un micropcesador Pentium 4, un sistema operativo Microsoft Windows XP y el programa de Metrohm TiNet 2.5 Light. En la Figura 2 se muestran varias curvas de valoración típicas obtenidas en ausencia (curva 1) y en presencia de diferentes concentraciones de analito (curvas 2-4). El cálculo de m_T^* y m_T se realiza a partir de los volúmenes de tensioactivo consumido en las valoraciones en presencia (V_T^*) y ausencia (V_T) de analito, conocida la concentración de tensioactivo reactivo en la disolución valorante y el volumen inicial de disolución en el vaso de valoración (25 mL). Los volúmenes consumidos en las valoraciones son automáticamente obtenidos por la aplicación informática.

2.3. Sistema químico tensioactivo-colorante

El sistema tensioactivo reactivo-colorante utilizado para implementar la metodología basada en agregación competitiva debe cumplir los siguientes requisitos:

- a) El tensioactivo reactivo y el colorante deben formar agregados mixtos que modifiquen las características espectrales del colorante con respecto a las obtenidas para éste en forma monomérica.
- b) El tensioactivo reactivo debe tener carga opuesta al o a los analitos iónicos a determinar o poseer grupos que le permitan interactuar fuertemente con analitos neutros, por ejemplo grupos de amonio cuaternario que den lugar a interacciones π -catión con analitos aromáticos.
- c) El colorante no debe interactuar con el o los analitos a las concentraciones de ambos presentes en el medio de valoración.

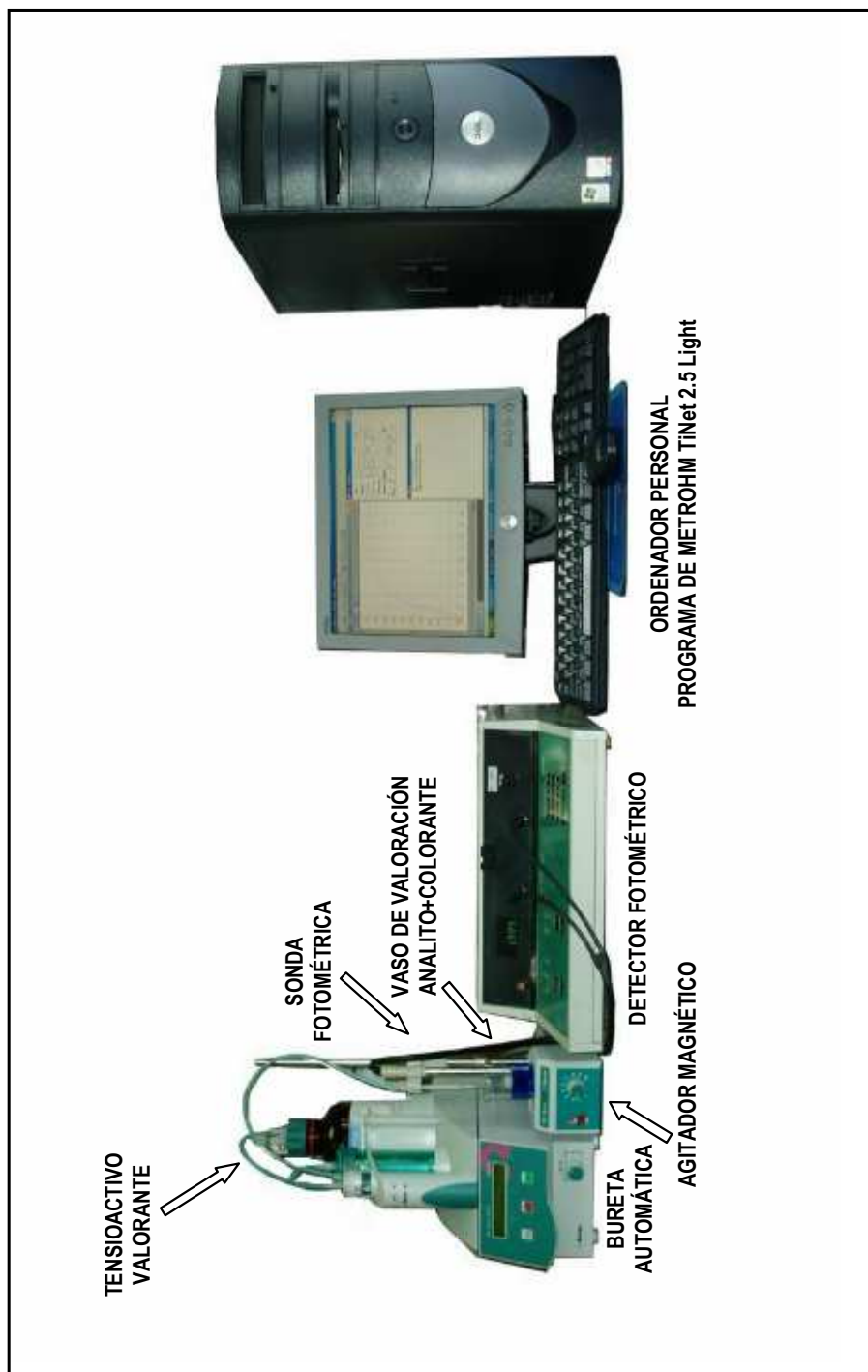


Figura 1. Sistema de medida usado para la implementación del método de grado de enlace tensioactivo-colorante.

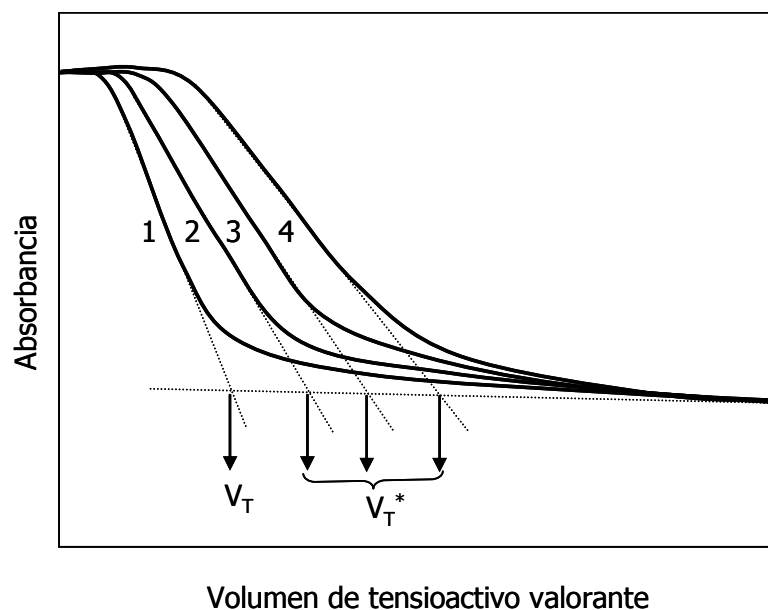


Figura 2. Curvas de valoración obtenidas en (1) ausencia de analito y (2-4) presencia de diferentes concentraciones de analito.

Hasta la realización de esta Tesis Doctoral, todos los métodos propuestos basados en la metodología GETC han hecho uso del sistema químico formado por el tensioactivo catiónico bromuro de didodecildimetilamonio (BrDDA) y el colorante aniónico Coomassie Azul Brillante G (CABG) y, por lo tanto, los analitos determinados han sido compuestos aniónicos o ionizables con carga negativa y compuestos neutros con anillos aromáticos en su estructura. A continuación comentaremos brevemente los métodos desarrollados en diferentes ámbitos de aplicación.

2.4. Determinación no específica de tensioactivos

La metodología GETC fue inicialmente propuesta por nuestro grupo de investigación para la determinación no específica de tensioactivos iónicos en muestras ambientales [7]. Esta metodología en combinación con una etapa previa de extracción en fase sólida, permitió desarrollar un método para la cuantificación de la concentración total de tensioactivos aniónicos, parámetro ampliamente utilizado para medir el grado de contaminación de aguas naturales y residuales [8]. Este método presenta importantes ventajas frente al método estándar utilizado para determinar dicho parámetro en

muestras acuosas medioambientales, el método del azul de metileno (AM). A continuación se comentan sus prestaciones:

- 1) Exactitud. Cuando al aplicar un método no específico, la respuesta analítica obtenida para tensioactivos con diferente estructura molecular no es uniforme, se produce un error sistemático en la determinación del parámetro global cuya magnitud depende de la diferencia entre las respuestas obtenidas y la composición de tensioactivos en la muestra. El método GETC proporciona respuestas uniformes para tensioactivos pertenecientes a diferentes grupos estructurales y distinto número de átomos de carbono en su cadena hidrocarbonada, al contrario que ocurre con el método AM cuya respuesta varía en función de la estructura molecular del tensioactivo.
- 2) Selectividad. Importantes interferencias del método AM entre las que cabe destacar el anión sulfuro, ácidos húmicos y tensioactivos no iónicos, especies que con frecuencia se encuentran presentes en muestras acuosas medioambientales, no interfieren en la determinación no específica de los tensioactivos aniónicos usando el método desarrollado, debido a que la metodología GETC responde preferentemente a compuestos anfifílicos iónicos con carga opuesta a la del tensioactivo reactivo y a que determinadas interferencias se eliminan en el proceso de extracción en fase sólida.
- 3) Sensibilidad. El límite de detección obtenido usando el método GETC es entre 3 y 9 veces inferior a los límites de detección obtenidos para los diferentes tensioactivos aniónicos utilizando el método AM.
- 4) Precisión. La desviación estándar relativa obtenida para el método propuesto incluida la etapa de tratamiento de muestra es de 2,5% para una cantidad total de tensioactivos aniónicos de 25 μg frente a 5,8% obtenida con el método AM para 100 μg de tensioactivos. Esto es debido a la simplicidad del método propuesto en contraste con el método AM en el que se realizan seis extracciones líquido-líquido.
- 5) Robustez. Usando el método GETC apenas se observa diferencia entre las desviaciones estándar relativas obtenidas dentro de ensayos y entre ensayos (2,5% y 2,8%, respectivamente), al contrario que para el método AM para el que la desviación estándar relativa entre ensayos aumenta hasta 8,7%.
- 6) Otras propiedades analíticas. El volumen de muestra usado en el método propuesto es inferior al requerido en el método AM debido a que la sensibilidad obtenida es mayor. También se reduce considerablemente el volumen de disolventes orgánicos

usados, de 900 a 60 mL, y el tiempo total del análisis, de 280 a 120 minutos, incluyendo calibración y análisis.

2.5. Determinación de drogas terapéuticas

La metodología GETC también ha sido utilizado con éxito para la determinación de compuestos anfílicos con estructura molecular muy diferente a la de los tensioactivos como es el caso de drogas terapéuticas anfílicas e hidrotrópicas. A continuación se comentan los resultados más relevantes obtenidos en este ámbito de aplicación.

2.5.1. Determinación de drogas anfílicas aniónicas y no iónicas

La metodología GETC se ha aplicado a la determinación de drogas terapéuticas anfílicas aniónicas y no iónicas pertenecientes a diferentes grupos estructurales: ácidos fenámicos [9], propiónicos y acéticos, indolinas, derivados del ácido glicirretínico, salicilatos, oxicams, pirazonas e hidrocortisonas [10]. La sensibilidad obtenida para la determinación de estas drogas varía en función de su estructura molecular, es decir del número de grupos aniónicos que posee y del tamaño de su región hidrófoba, lo que determina la fuerza de las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas que se producen entre tensioactivo y droga.

En la Tabla 1 se muestran los valores de grado de enlace tensioactivo-droga (β_A) obtenidos para diferentes drogas terapéuticas ordenados dentro de su grupo estructural de mayor a menor constante de partición octanol/agua. El valor de β_A es mayor para drogas aniónicas que para drogas neutras, así por ejemplo, el valor de grado de enlace es mayor para el diflunisal con un grupo aniónico que para el fenilsalicilato que no tiene grupos iónicos. En cuanto a la influencia del número de grupos iónicos, el valor de grado de enlace aumenta al aumentar el número de grupos aniónicos en la molécula, así la carbenoxolona que posee dos grupos carboxílicos en su estructura presenta un valor de β_A aproximadamente el doble que la enoxolona que sólo tiene un grupo carboxílico. Finalmente, dentro de cada grupo estructural, el valor de grado de enlace generalmente aumenta a medida que lo hace el tamaño de la región hidrófoba y por lo tanto, la hidrofobicidad de la droga, aunque se producen algunas excepciones (por ejemplo, los oxicams).

Los métodos desarrollados [9,10] se han aplicado al análisis de una gran variedad de fármacos: disoluciones, tabletas, cápsulas, granulados efervescentes, supositorios, cremas y geles, con un mínimo tratamiento de la muestra que consiste en la dilución de las muestras líquidas y la puesta en disolución de las cremas, geles y muestras sólidas. En el caso de fármacos que contengan varias drogas que den lugar a similares grados de enlace tensioactivo reactivo-droga es necesario llevar a cabo un proceso previo de separación de las mismas.

2.5.2. Determinación de drogas hidrotrópicas

Los compuestos hidrotrópicos, también denominados hidrótopos, al igual que los compuestos anfifílicos, poseen dos regiones en su molécula, una hidrófoba y otra hidrófila, pero su región hidrófoba tiene un tamaño inferior a la de las moléculas anfifílicas. Este tipo de compuestos, al igual que los compuestos anfifílicos, pueden dar lugar a la formación de agregados mixtos mediante su interacción con moléculas de tensioactivo [11] y, por lo tanto, pueden ser determinados mediante la metodología de grado de enlace tensioactivo colorante.

Los principios activos hidrotrópicos determinados hasta la fecha usando la metodología de grado de enlace han sido ácidos aromáticos carboxílicos (ácido salicílico, ácido benzoico, ácido acetil salicílico y ácido p-amino benzoico) y sulfónicos (ácido p-hidroxibenzenosulfónico) y polihidroxibenzenos (resorcinol) [11]. En la Tabla 2 se muestran los valores de β_A obtenidos para estos compuestos y sus correspondientes constantes octanol/agua. En general, los valores de grado de enlace tensioactivo-hidrótopo son inferiores a los de tensioactivo-compuesto anfifílico (comparar los valores de β_A incluidos en las Tablas 1 y 2) debido a que las interacciones hidrofóbicas entre tensioactivo reactivo e hidrótopo son más débiles que las que se producen entre tensioactivo reactivo y anfifilo, dado el reducido tamaño de la región hidrófoba de los compuestos hidrotrópicos. Al igual que para los compuestos anfifílicos, el valor de β_A aumenta a medida que aumenta la hidrofobicidad del compuesto. Para compuestos con similar hidrofobicidad, el valor de grado de enlace es mayor si el grupo iónico es un grupo

Tabla 1. Grado de enlace BrDDA-analito (β_A) obtenido para principios activos anfífilos aniónicos y no iónicos utilizando el sistema tensioactivo-colorante BrDDA-CABG.

Droga	$\beta_A \pm s$	Log K_{ow}
Ácidos fenámicos		
Ácido meclofenámico	2,55 ± 0,06	5,9
Ácido flufenámico	2,55 ± 0,06	5,6
Ácido mefenámico	2,31 ± 0,05	5,3
Ácido niflúmico	2,28 ± 0,03	4,7
Ácidos propiónicos		
Flurbiprofeno	2,4 ± 0,2	4,2
Ibuprofeno	2,35 ± 0,04	4,0
Naproxeno	1,38 ± 0,02	3,2
Ketoprofeno	1,12 ± 0,02	3,1
Ácidos acéticos		
Diclofenaco	3,08 ± 0,06	4,5
Felbinaco	1,91 ± 0,02	3,3
Zomepiraco	1,13 ± 0,01	2,3
Indolinas		
Indometacina	4,3 ± 0,1	4,3
Sulindaco	2,92 ± 0,07	3,4
Derivados del ácido glicirretínico		
Carbenoxolona	6,9 ± 0,2	7,3
Enoxolona	3,29 ± 0,05	6,6
Salicilatos		
Diflunisal	2,47 ± 0,05	4,3
Fenil salicilato	0,53 ± 0,01	3,6
Oxicams		
Meloxicam	4,32 ± 0,07	3,4
Piroxicam	6,9 ± 0,3	3,1
Tenoxicam	7,4 ± 0,1	1,4
Pirazolonas		
Fenilbutazona	2,77 ± 0,03	3,2
Sulfpirazona	3,4 ± 0,3	2,3
Hidrocortisonas		
Dexametasona	0,204 ± 0,004	1,8
Prednisolona	0,198 ± 0,004	1,6

sulfonato que si es un grupo carboxilato (comparar los valores de grado de enlace para el ácido p-aminobenzoico y p-hidroxibencenosulfónico), debido a que la carga negativa se encuentra localizada sobre el grupo sulfonato, mientras que en los carboxilatos se encuentra deslocalizada entre el anillo aromático y el grupo iónico. El ácido salicílico es el que presenta un valor de β_A más elevado con diferencia. Este derivado del ácido benzoico interacciona fuertemente con tensioactivos de amonio cuaternario, siendo dicha interacción específica ya que sólo se produce cuando existe un grupo hidroxilo en posición orto.

Al igual que para los principios activos anfifílicos, la determinación de las drogas hidrotópicas se puede realizar directamente en una gran variedad de fármacos con un mínimo tratamiento de muestra [11], lo que simplifica el análisis y contribuye a obtener una elevada frecuencia de muestreo.

Tabla 2. Grado de enlace BrDDA-analito (β_A) obtenido para principios activos hidrotópicos utilizando el sistema tensioactivo-colorante BrDDA-CABG

Droga	$\beta_A \pm s$	Log $K_{ow} \pm s$
Ácidos aromáticos carboxílicos		
Ácido salicílico	1,62 \pm 0,01	2,1 \pm 0,2
Ácido benzoico	0,095 \pm 0,001	1,9 \pm 0,2
Ácido acetilsalicílico	0,083 \pm 0,01	1,2 \pm 0,2
Ácido p-aminobenzoico	0,013 \pm 0,001	0,0 \pm 0,2
Ácidos aromáticos sulfónicos		
Ácido p-hidroxibencenosulfónico	0,14 \pm 0,01	0,2 \pm 0,2
Polihidroxibencenos		
Resorcinol	0,056 \pm 0,001	0,8 \pm 0,2

2.6. Determinación de aditivos alimentarios.

Se ha propuesto un método para la determinación de L-glutamato en alimentos elaborados basado en la metodología GETC [12]. El L-glutamato es un aminoácido ampliamente utilizado como potenciador del sabor en la elaboración de condimentos, salsas, cremas y otros productos alimenticios. Su concentración en los alimentos debe

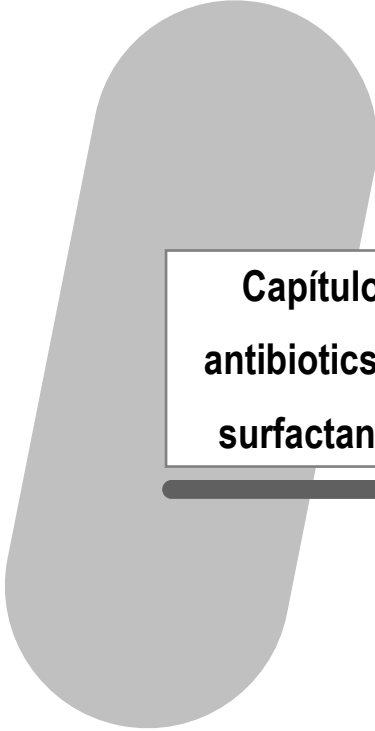
ser controlada ya que la ingesta de elevadas cantidades de este aditivo puede originar problemas de salud, por este motivo la concentración máxima permitida de L-glutamato en alimentos elaborados se encuentra legislada (en Europa, 10 g Kg⁻¹).

Este aditivo es un compuesto con carácter hidrotópico, que interacciona con el tensioactivo valorante, BrDDA, mediante interacciones electrostáticas, además de hidrofóbicas, siendo éstas últimas muy débiles dado el reducido tamaño de su región hidrófoba. La constante de enlace BrDDA-L-glutamato obtenida es de $(7,1 \pm 0,1) \times 10^{-3}$ M.

El método propuesto aventaja a los métodos enzimáticos, los más ampliamente usados en la industria alimentaria para la determinación de L-glutamato, en selectividad, rapidez y coste, el que se reduce aproximadamente 30 veces, y evita los problemas derivados de la inestabilidad de las enzimas. El tratamiento de la muestra previo a la determinación basada en agregación competitiva es muy simple, consiste en la disolución del analito en agua y filtrado de la muestra. Finalmente, el método propuesto es muy preciso, las desviaciones estándar relativas para el proceso analítico completo se encuentran en el intervalo 1,4-2,4 %.

3. BIBLIOGRAFÍA

- [1] B. Simončič, M. Kert, *Dyes Pig.* 54 (2002) 221.
- [2] B. Simončič, J. Špan, *Dyes Pig.* 46 (2000) 1.
- [3] B. Simončič, M. Kert, *Dyes Pig.* 71 (2006) 43.
- [4] B. Simončič, M. Kert, *Dyes Pig.* 76 (2008) 104.
- [5] M. Kert, B. Simončič, , *Dyes Pig.* 79 (2008) 59.
- [6] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez.Bendito, *Analyst* 126 (2001) 126.
- [7] R. Fabios, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito. *Anal. Chem.* 75 (2003) 6011.
- [8] A. Pedraza, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez Bendito, *Anal. Chim. Acta* 588 (2007) 252.
- [9] A. Pedraza, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez Bendito, *Anal. Chim. Acta* 522 (2004) 89.
- [10] A. Pedraza, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Analyst* 131 (2006) 81.
- [11] A. Pedraza, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez Bendito, *Analyst* 130 (2005) 1102.
- [12] A. Pedraza, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez Bendito, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 2297.



**Capítulo 1. Quantitation of fusidane
antibiotics in pharmaceuticals using the
surfactant-dye binding degree method**



ACA, 2005, 549, 159-165

Quantitation of fusidane antibiotics in pharmaceuticals using the surfactant–dye binding degree method

Esther María Costi, María Dolores Sicilia, Soledad Rubio, Dolores Pérez-Bendito*

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Córdoba, Edificio Anexo Marie Curie, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba, Spain

Received 26 April 2005; received in revised form 9 June 2005; accepted 13 June 2005

Available online 18 July 2005

Abstract

The determination of fusidic acid (FA)/sodium fusidate (SF) in dosage forms based on their modification of the binding degree of the cationic surfactant didodecyldimethylammonium bromide (DDABr) to the anionic dye Coomassie Brilliant Blue G (CBBG) was proposed. The formation of mixed DDABr–CBBG aggregates was monitored from changes in the spectral features of the dye. Addition of fusidane antibiotic to DDABr–CBBG aqueous mixtures caused a decrease in the surfactant–dye binding degree as a result of the formation of DDABr–drug aggregates. At the working pH (7.0), FA and SF were as fusidate anion; therefore, both hydrophobic and attractive electrostatic interactions were responsible for the formation of these mixed surfactant–drug aggregates. Based on the mathematical expression previously derived for determining surfactants, a linear calibration in the fusidane antibiotic concentration range 1.9–70 mg L⁻¹ was obtained. The surfactant to dye binding degree (SDBD) method offered important advantages over conventional method used for quality control of fusidane antibiotics in terms of sensitivity (detection limit = 0.6 mg L⁻¹), selectivity, which permitted a minimum sample treatment (only dissolution of dosage forms), precision [relative standard deviations for the whole analytical process = 1.5–2.0% (n = 6)], rapidity, because of the

speed of both sample treatment and determination step, required instrumentation (a photometric titrator) and cost. Pharmaceutical samples analyzed included tablets, pomades and creams.

Keywords: Fusidane; Surfactant; Mixed aggregate; Fusidane antibiotics; Dye-surfactant and drug-surfactant binding degree

1. Introduction

The quality control of drugs in pharmaceuticals demands the use of simple, rapid and low cost analytical methods. Most therapeutic drugs are selected or designed to be amphiphilic in order to penetrate cells and tissues and to favor interaction of drug molecules with receptor sites. So, analytical methodologies exploiting the amphiphilic character of drugs could be extensively used for their determination and have general application for their quality control in pharmaceuticals.

Investigations performed by our research group in the last years about the analytical use of the effect of solutes on the aggregation behavior of amphiphiles have led to the development of two new methodologies: the mixed aggregate [1,2] (MA) and the surfactant–dye binding degree [3] (SDBD) methods. Both permit the simple and rapid determination of amphiphilic compounds based on the measurement of aggregation parameters, namely, the critical aggregate concentration, cac (MA method) and the degree of binding of a surfactant to dye molecules (SDBD method).

Because the basis of these methodologies is different but their application requires the same experimental setup, they can be considered complementary, with high potential to cover a wide number of applications. Thus, the sensitivity of the MA method increases as the cac value of the amphiphile (analyte) decreases. So, this methodology is intrinsically more sensitive for non-ionic amphiphiles, which feature lower cac values (10^{-4} to 10^{-5} M) than the ionic ones (10^{-1} to 10^{-3} M). On the other hand, the sensitivity of the SDBD method depends on the binding interactions involved in the formation of surfactant–amphiphilic analyte aggregates (hydrophobic, hydrogen bonding and/or ionic interactions). The energies involved in these bonding vary considerably. Thus, hydrophobic interactions defined as dipole–dipole, dipole-induced dipole and dispersive interactions have binding energies ranging from 1 to 10 kcal/mol. Hydrogen bonding involving polar groups have similar energies (5–10 kcal/mol), whereas ionic or electrostatic interactions are in the range 50 to 200 kcal/mol [4]. So, the SDBD method is especially sensitive for the determination of ionic amphiphiles, thus complementing the applicability of the MA method.

Up to now, two application fields have been developed which are consequence of the characteristics of these methodologies. On the one hand, they provide similar and global

response for amphiphiles bearing hydrophilic groups of the same nature (e.g., anionic, cationic or non-charged highly polar-groups). This characteristic has permitted the development of analytical methods for the accurate determination of global indexes (e.g., total concentration of nonionic [1,5], anionic [3,6] and cationic [7] surfactants in environmental samples), which have filled a gap in this field, since instrumental responses in conventional monomer-based methods [8,9] depend on the molecular weight of the amphiphile, thus preventing their accurate quantitation. On the other hand, both methodologies have not response towards inorganic ions and non-amphiphilic organic compounds, and this characteristic has permitted the quality control of specific amphiphiles (e.g., drugs in pharmaceuticals [10–13], additives in foodstuffs [14] etc.). Because their high selectivity, the use of these methodologies for quality control of products involving amphiphiles is highly valuable, since the sample treatment step is reduced to the dissolution of analytes. To date, most applications developed have involved to the MA method [1,2,5–7,10–12,14,15]. The SDBD method, recently described, has also proved to be valuable for the determination of global indexes [3] and quality control of drugs [13], surpassing to the MA method in the determination of ionic amphiphiles in terms of sensitivity and selectivity, but the scarce applications developed have not established the real scope of this method.

In this work, we explore the potential of the SDBD method to determine amphiphilic drugs with steroid-like structure. Fusidane antibiotics [fusidic acid (FA) and its sodium salt, sodium fusidate (SF)] were selected for this purpose. These antibacterial agents have unique structural features (Fig. 1) including a tetracyclic ring system with an unusual chair–boat–chair conformation and a carboxylic acid bearing side chain attached by a double bond. This steroid-like structure is responsible for the high penetration of FA and SF in tissues and for the absence of cross-resistance and cross-allergy with other clinically used antibiotics, which have made fusidane drugs highly valuable antibiotic, especially for skin and eye infections [16,17]. Only a few analytical methods have been reported to the date for the quantitative determination of fusidane antibiotics in dosage forms [18–22]. A common characteristic of these approaches has been the need of separating FA or SF from sample matrix prior to their determination in order to avoid interferences. Liquid–liquid extraction prior to colorimetry [18] or derivative-UV-spectrometry [19] and chromatographic techniques (TLC [18], HPTLC [20] or LC [21,22]) have been proposed.

2.2. Reagents

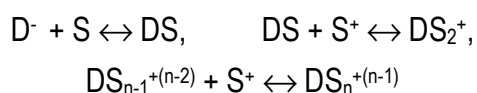
All chemicals were analytical-reagent grade and were used as supplied. A 0.14 mM aqueous solution of Coomassie Brilliant Blue G (CBBG, Sigma) was prepared by dissolving 0.125 g of the reagent in 1 L of distilled water with sonication for 15 min. This solution was prepared at least 24 h prior to use and was stable for 1 month. The buffer solution used consisted of 0.25 M triethanolamine (TEA) with the pH adjusted to 7.0 with 2 M HCl. A 2.0 mM aqueous solution of didodecyldimethylammonium bromide (DDABr, Fluka) and a stock solution of sodium fusidate (0.2 g L⁻¹, Sigma) were prepared in distilled water. The antibiotic stock solution was stable for at least 2 weeks.

2.3. Procedure

In a 25-mL volumetric flask were placed, in sequence, 1.8 mL of 0.14 mM CBBG solution, 5 mL of TEA buffer (0.25 M, pH = 7.0), appropriate volumes of standard or treated pharmaceutical sample solution to give a final fusidane antibiotic concentration between about 2.0 and 70 mg L⁻¹, and distilled water to the mark. This solution was placed in a 50-mL titration vessel and titrated with 2.0 mM DDABr delivered from the buret at a rate of 10 mL min⁻¹. The stirring rate was set at 700 rpm. Titration curves were obtained by recording the absorbance at 610 nm as a function of the titrant volume.

2.4. Calibration

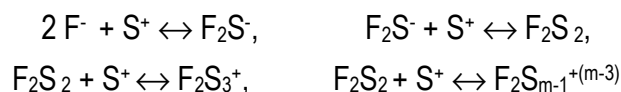
The concentration of fusidane antibiotic (FA and SF) was determined from calibration graphs constructed on the basis of the mathematical expression previously derived for the quantitation of surfactants [3]. The anionic dye CBBG (A⁻) induces the formation of cationic surfactant DDABr (S⁺) aggregates according to the following scheme:



The extend of the dye-induced aggregates ($DS_n^{+(n-1)}$) formed can be expressed in terms of the CBBG-DDABr binding degree (β_D), which can be calculated from:

$$\beta_D = \frac{m_S - m_{S,M}}{m_D} \quad (1)$$

where m_S denotes the surfactant concentration required to reach a determined β_D value, m_D is the total concentration of dye in the aqueous surfactant-dye mixture and $m_{S,M}$ is the concentration of surfactant in monomeric form. When FA or SF is added to the CBBG-DDABr aqueous mixture at the working pH 7.0, fusidate anion (F^- , $pK_a = 3.8$) interacts with the cationic surfactant to form successive aggregates according to the scheme:



As a result a decrease of the β_D value is observed, and this parameter is now calculated from:

$$\beta_D = \frac{m_S^* - m_{S,M} - \beta_F m_F}{m_D} \quad (2)$$

where m_S^* is the surfactant reagent concentration necessary to reach the same β_D value in the presence of fusidate than that obtained in its absence, β_F is the fusidate-surfactant binding degree and m_F the fusidate concentration. Combination of Eq. (1) and (2) gives:

$$m_S^* - m_S = \beta_F m_F \quad (3)$$

from which calibrations for fusidane antibiotics are obtained by plotting the parameter $m_S^* - m_S$ as a function of m_F . The values of m_S^* and m_S are calculated from the volumes of DDABr consumed in titrations performed in the absence (V_S) and presence (V_S^*) of antibiotic, respectively (see Fig. 2B).

2.5. Quantitation of fusidane antibiotics in pharmaceutical preparations

The pharmaceutical samples analyzed were tablets, pomades and creams. Their composition is given in Table 1. An amount of sample containing about 250 mg (tablets) or about 20 mg (pomades and creams) of fusidane antibiotic was accurately weighed and dissolved in about 800 mL of distilled water (tablets) or 40 mL of methanol (pomades and creams) with magnetic stirring for 30 min to aid dissolution of samples. If any insoluble material was present in the solution after this treatment, it was removed by filtration and washed several times with water (tablets) or methanol (pomades and creams). Dissolved samples were diluted to 1 L with distilled water (tablets) or to 50 mL with methanol (pomades and creams) and aliquots of these sample solutions were analysed as described above.

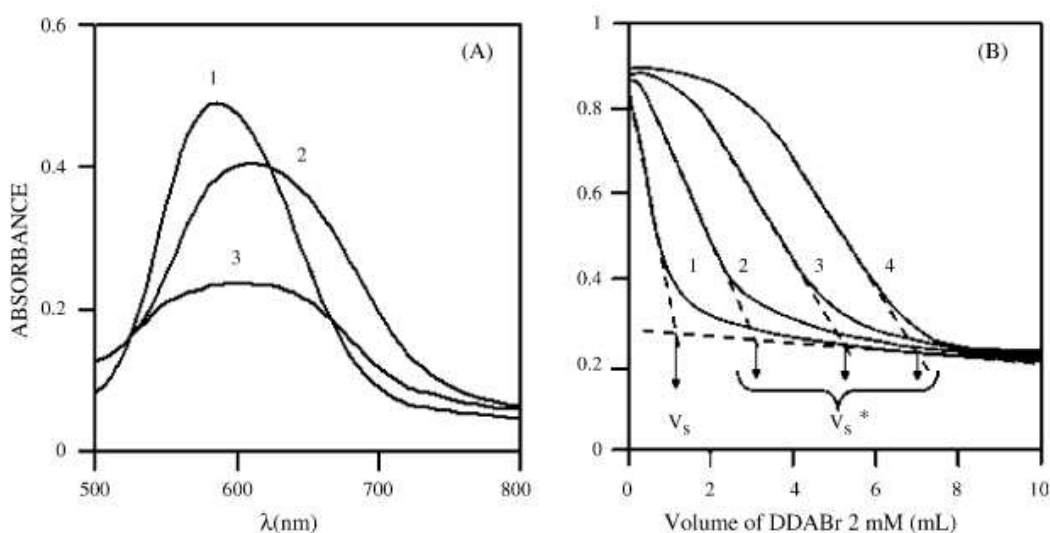


Fig. 2. (A) Spectra for CBBG (10 μM) in (1) the absence and (2,3) the presence of DDABr: (2) 18 μM and (3) 56 μM; (B) variation of the absorbance of CBBG (10 μM) at 590 nm as a function of the volume of titrant (2 mM DDABr) added to a titration vessel containing (1) non-antibiotic, or sodium fusidate concentrations of (2) 20 mg L⁻¹, (3) 40 mg L⁻¹ and (4) 60 mg L⁻¹; [TEA buffer] = 0.05 M; pH = 7.0.

Table 1. Determination of fusidane antibiotics in pharmaceuticals

Fusidane antibiotic	Commercial formulation ^a	Fusidane antibiotic concentration (mg g ⁻¹)	
		Nominal value	Found ^b
Sodium fusidate	Fucidine (tablets)	477	477 (7)
	Fucidine (pomade)	20	19.8 (0.4)
Fusidic acid	Fucidine (cream)	20	20.6 (0.8)
	Fucidine H (cream)	20	20.1 (0.6)
	Fucibet (cream)	20	20.2 (0.7)

^a Composition of commercial formulations (Farmacusi, Spain): Fucidine (tablets): lactose, magnesium stearate, titanium oxide and other excipients; Fucidine (pomade): cetylic alcohol, lanoline, vaseline and vaseline oil; Fucidine (cream): butylhydroxyanisol, cetylic alcohol, glycerol, polysorbate 60, vaseline and other excipients; Fucidine H (cream): hydrocortisone acetate 1%, butylhydroxyanisol, cetylic alcohol, glycerol, polysorbate 60, vaseline and other excipients; Fucibet (cream): betametazone valerate 0.1%, chlorocresol, cetomacrogol 1000, cetostearyl alcohol, sodium dihydrogenphosphate, vaseline and other excipients.

^b Average of six determinations. Standard deviations are given in parentheses

3. Results and discussion

3.1. Study of the dye–surfactant interaction

Molecular interactions between dye (D) and surfactant (S) molecules bearing charge of opposite sign result in the formation of mixed dye–surfactant aggregates [23–25]. Thus, molecules of the anionic dye Coomassie Brilliant Blue G (CBBG) interact with molecules of the cationic surfactant didodecyldimethylammonium bromide (DDABr) to form mixed DDABr–CBBG aggregates at surfactant concentrations higher than a threshold value ($11.8 \pm 0.4 \mu\text{M}$ under the experimental conditions recommended for the determination of fusidane antibiotics). The formation of these mixed aggregates can be monitored from changes in the spectral features of CBBG. These spectral features vary as a function of the cationic surfactant concentration in the dye–surfactant aqueous mixture (compare spectra 1, 2 and 3 in Fig. 2A), due to the variation of the DDABr–CBBG binding degree (β_D) as the DDABr/CBBG molar ratio is increased. The formation of mixed aggregates with DDABr:CBBG stoichiometries between 1:1 and 5:1 have been previously reported [3].

3.2. Formation of drug–surfactant aggregates

Addition of fusidane antibiotic to a DDABr–CBBG aqueous mixture, at the working pH 7.0 (pK_a of fusidic acid 3.8) resulted in changes in the CBBG spectral features compatible with a decrease in the DDABr concentration able to interact with the dye, i.e., in the presence of antibiotic, a decrease in the DDABr–CBBG binding degree occurred. Fusidate anion competed with CBBG to interact with DDABr and as a result two different mixed aggregates were formed in ternary drug–surfactant–dye aqueous mixtures; namely, DDABr–fusidane and DDABr–CBBG aggregates. Therefore, in the presence of fusidane antibiotic the cationic surfactant concentration need to form CBBG–DDABr aggregates with a determined β_D increased compared with that required in its absence (compare curve 1 with curves 2–4 in Fig. 2B). Confirmation of the formation of fusidate–DDABr aggregates was obtained from light scattering measurements. Turbidity was observed for solutions containing fusidane antibiotic (74 μM , pH = 7.0) under addition of DDABr. The turbidity increased as the surfactant concentration did up to 1:1 DDABr: fusidate molar ratios (compare spectra 1 and 2 in Fig. 3A). Further increases in the cationic surfactant concentration resulted in reduced turbidity and, then, decreased absorbance measurements (compare spectra 2 and 3 in Fig. 3A).

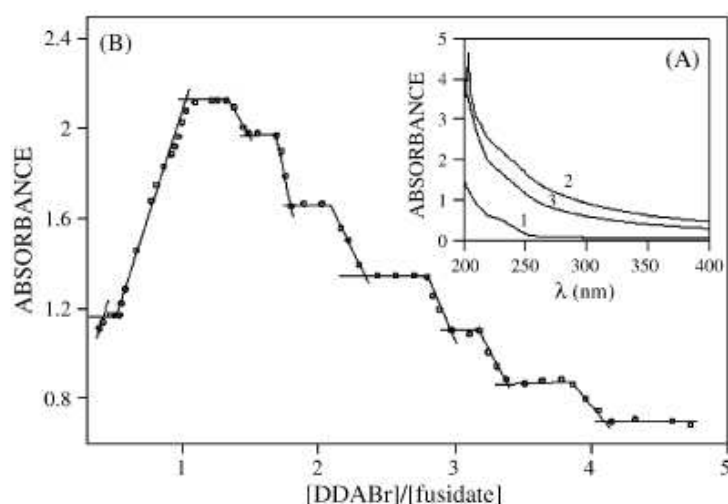


Fig. 3. (A) Spectra for sodium fusidate (74 μM) in (1) the absence and (2,3) the presence of DDABr (2) 74 μM and (3) 150 μM ; (B) variation of the absorbance of sodium fusidate (74 μM) at 230 nm as a function of the [DDABr]/[fusidate] molar ratio; [TEA buffer] = 0.05 M; pH = 7.0.

3.3. Stoichiometry of drug-surfactant aggregates

In order to investigate the possibility of the formation of DDABr–fusidate aggregates with a well-defined stoichiometry, a set of experiments which involved the plot of the variation of the absorbance measured at 230 nm as a function of the [DDABr]/[fusidate] molar ratio, were performed. Experiments were carried out by mixing increasing DDABr concentrations within the range of analytical interest (0–350 μM) and a constant concentration of sodium fusidate (74 μM), and measuring the absorbance at a fixed time (5 min) after mixing. The broken line obtained (Fig. 3B) indicated the formation of DDABr: fusidate aggregates of different stoichiometries (between 1:2 and 4:1) in proportion to the DDABr concentration increased. According to the above results and assuming a mononuclear model for the formation of surfactant–drug aggregates, it can be asserted that mixed DDABr–fusidate aggregates with general formula $F_2 S_m^{+(m-2)}$ are formed, the m value depending on the DDABr concentration in the titration medium.

3.4. Optimization

Experimental conditions were optimized by changing each variable in turn while keeping all other constant. Conditions (pH, TEA buffer, organic additive and dye concentration, ionic strength and temperature) were optimized for obtaining the best possible sensitivity in the quantification of antibiotics and the highest possible precision in the determination of the endpoint of titration curves.

The influence of the CBBG concentration on m_s , m_s^* and the measurement parameter ($m_s^* - m_s$) was studied over the interval 8–25 μM . At dye concentrations lower than 8 μM , irreproducibility in the determination of the titration end-point was obtained due to the slow change of the absorbance as a function of the DDABr concentration during titration. At dye concentrations higher than 25 μM , the initial absorbance measured at 610 nm was out of the measurement range of the photometric detection unit. As it was expected, the values of both m_s^* and m_s linearly increased as a function of the CBBG concentration (Fig. 4A). The concentration of dye in the titration vessel did not affect the DDABr–drug binding degree and, therefore, the measurement parameter was kept constant over the whole dye concentration range studied.

The effect of the pH was studied by adjusting it with hydrochloric acid and sodium hydroxide. Outside the 6.5–8.0 pH range, the titration curves showed a very short

straight line before the end-point, which resulted in lack of precision in the determination of V_S^* and V_S . A 0.05 M triethanolamine (TEA) buffer was used to adjust the pH inside this range. Fig. 4B shows the influence of this variable on m_S^* and m_S . Both parameters slightly decreased as the pH of the titration medium did; however, their difference remained constant over the pH range studied. This behavior indicated that the DDABr–analyte binding degree remained constant between 6.5 and 8 and since the pK_a value of fusidic acid is 3.8, both electrostatic and hydrophobic interactions were responsible for DDABr–fusidate antibiotic aggregates formation.

The TEA buffer has been previously reported to disfavor the formation of DDABr–CBBG aggregates as a result of the interaction between triethanolammonium cation and the anionic dye [3]. Therefore, both m_S^* and m_S slightly increased as a function of TEA concentration (Fig. 4C). Buffer concentration was found, however, not to affect the formation of DDABr–fusidate aggregates and the measurement parameter ($m_S^* - m_S$) was kept constant over the all TEA interval studied (0.04–0.08 M). Interaction between triethanolammonium and fusidate, if any, was not strong enough to affect the surfactant–drug binding degree.

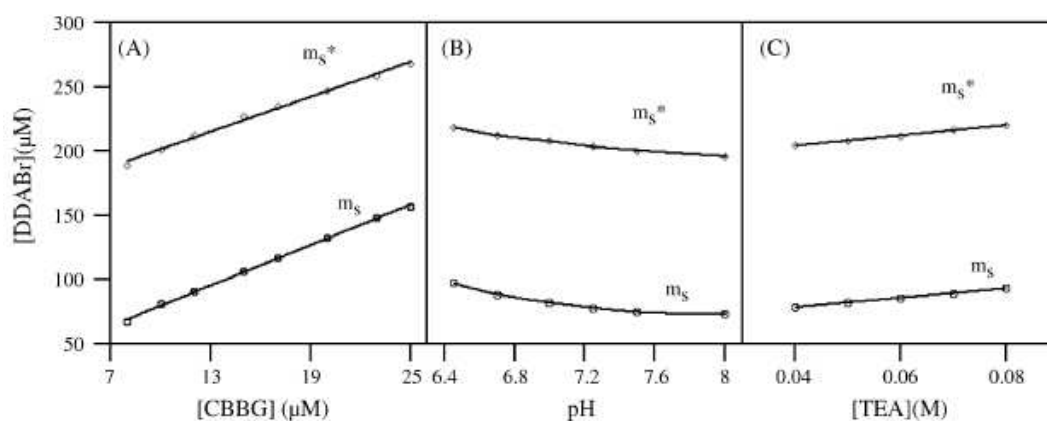


Fig. 4. Influence of (A) CBBG concentration, (B) pH and (C) TEA buffer concentration on m_S^* and m_S , [Sodium fusidate] = 20 mg L⁻¹; (A) and (C) pH = 7.0, (B) [TEA buffer] = 0.05 M; (B) and (C) [CBBG] = 10 μM.

The effect of electrolytes on the formation of DDABr–CBBG and DDABr–fusidate aggregates and on the measurement parameter was investigated by using sodium chloride concentrations between 0 and 0.1 M. Electrolytes have been previously reported to decrease the extent of binding of mixed cationic–anionic aggregates as a result of

decreased electrostatic interactions between the oppositely charged groups [3,15]. Sodium chloride up to 0.08 M increased the measurement parameter by a factor of 1.5 (i.e., the formation of surfactant–dye aggregates was disfavored in higher extent than that of surfactant–drug aggregates) and then it kept constant for higher electrolyte concentrations, indicating that both aggregates behaved similarly. Since the influence of sodium chloride on mixed aggregates formation was only significant for electrolyte/drug molar ratios above 100, electrolytes are not expected to cause interference in the determination of fusidane antibiotics in pharmaceuticals.

The temperature did not affect m_S^* , m_S and the measurement parameter over the interval 20–60° C; so, measurements could be performed at room temperature.

Because pomade and cream fusidane antibiotics are dissolved in organic solvents for analysis, the effect of ethanol and methanol on the measurement parameter was examined at concentrations up to 10%. Methanol and ethanol did not affect m_S^* and m_S values up to 10 and 6%, respectively. Higher ethanol percentages changed the shape of titration curves, which detracted from precision in the end-point determination.

3.5. Calibration

Calibration graphs, constructed by plotting $m_S^* - m_S$ as a function of SF concentration, were linear in the range 1.9–70 mg L⁻¹. The standard error of the estimate was 0.94 and the correlation coefficient 0.998. The detection limit (calculated as three-fold the standard deviation of m_S) was 0.6 mg L⁻¹. The intercept value of the calibration graph was not significantly different from zero ($3 \pm 4 \mu\text{M}$) and the sensitivity, defined as the slope of the calibration graph was $5.9 \pm 0.1 \mu\text{M L mg}^{-1}$. From these results it could be inferred that analytical measurements obtained for fusidane antibiotics fitted to Eq. (1) and the drug-DDABr binding degree (β_F) remained constant over the whole linear interval obtained. So, ternary mixtures of fusidane antibiotic-DDABr–CBBG behaved as those of surfactant analyte–DDABr–CBBG, and mathematical expressions previously derived to determine surfactants [3] could be used to quantify SF and FA. The value of the binding degree of fusidate to DDABr molecules at the titration end-point could be easily calculated from the slope obtained for SF, taking into account its molecular weight. The β_F value obtained was 3.17 ± 0.05 , therefore, 3:1 DDABr: fusidate aggregates ($F_2S_6^{+4}$) were mainly present in the titration medium at the titration end-point. The

precision, expressed as relative standard deviation, was 1.1% (n = 11) for a concentration of FS of 20.0 mg L⁻¹.

3.6. Quantitation of fusidane antibiotics in pharmaceuticals

Validation of the proposed method was carried out by quantifying both SF and FA in commercially available pharmaceutical preparations (tablets, creams and pomades). Results obtained for the five pharmaceuticals analyzed (Table 1) were consistent with nominal values, which demonstrated that no interference from other active ingredients (e.g., hydrocortisone, betametazone, etc.) or excipients (e.g., cetylic alcohol, polysorbate 60, etc.) occurred, which permitted the accurate determination of fusidane antibiotics with a minimum sample treatment (see Section 2).

4. Conclusions

The SDBD method is a valuable alternative to the conventional monomers-based methods proposed for the quality control of fusidane antibiotics [18–22]. It surpasses them in terms of sensitivity (the quantification limit of the SDBD method was one order of magnitude lesser than that provided by monomer-based methods), selectivity (monomer-based methods require the separation of the target analytes, SF and FA, from other matrix components, while only dissolution of the pharmaceuticals is required using the SDBD method), precision (relative standard deviations between 1.5 and 2.0% (n = 6) were obtained for the whole analytical process), rapidity (both in sample treatment and determination step), and cost (a simple photometric titrator is required). Although more applications have to be developed to delimit the real scope of the SDBD method for the quality control of ionic amphiphiles in manufactured products, the results here obtained seems to indicate that it will be a valuable strategy for this purpose.

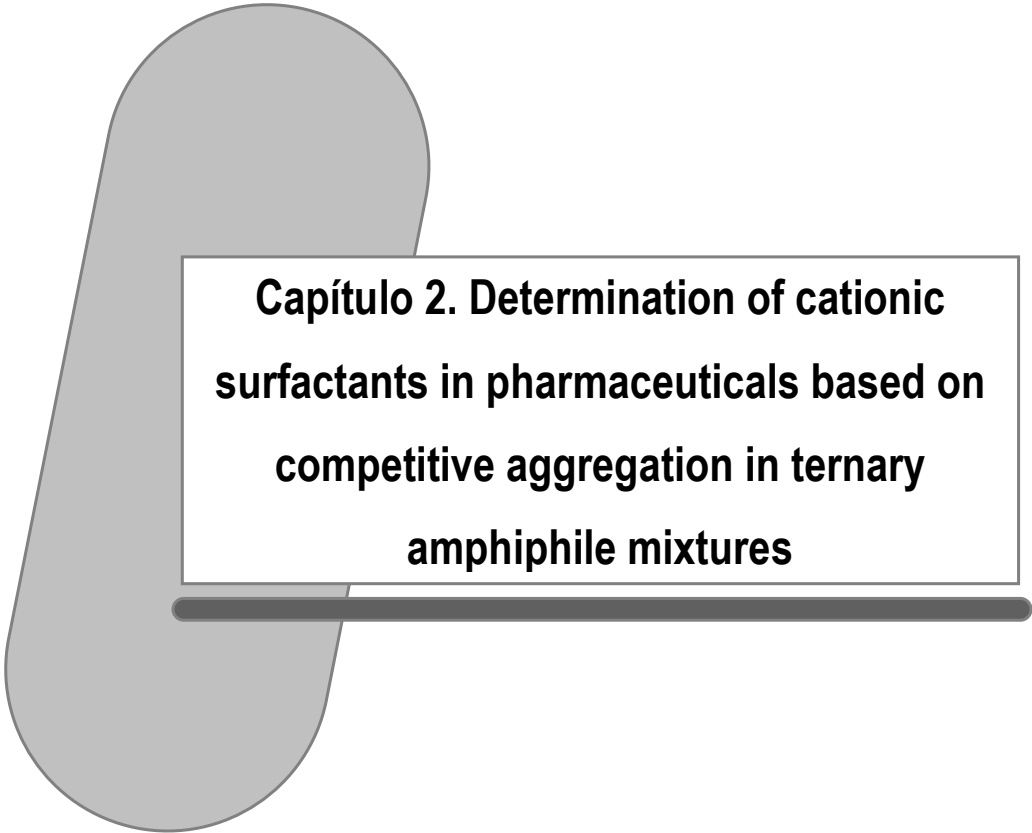
Acknowledgement

The authors gratefully acknowledge financial support from MCyT (project no. BQU2002-01017).

References

- [1] D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 67 (1995) 1872.
- [2] E. Borrego, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 241.
- [3] R. Fabios, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6011.
- [4] M.C. Hennion, *J. Chromatog. A* 853 (1999) 3.
- [5] E. Borrego, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. AOAC Int.* 85 (2002) 173.
- [6] I. Casero, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 345 (1997) 75.
- [7] E. Borrego, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 75 (1999) 181.
- [8] J. Waters, Recent developments in the analysis of surfactants, in: M.R. Porter (Ed.), *Critical Reports on Applied Chemistry*, vol. 32, Elsevier, New York, NY, 1991.
- [9] J.E. Grenberg, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, American Public Health Association, Washington, DC, 1980, pp. 530–532.
- [10] E. Borrego, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 362 (1998) 285.
- [11] M.P. San Andrés, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Pharm. Sci.* 87 (1998) 821.
- [12] M.P. San Andrés, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Analyst* 123 (1998) 1079.
- [13] A. Pedraza, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 522 (2004) 89.
- [14] E. Borrego, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 384 (1999) 105
- [15] E. Borrego, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Analyst* 125 (2000) 1507.
- [16] J.D. Wilkinson, *Brit. J. Dermatol.* 139 (1998) 37.
- [17] C. Golledge, *Int. J. Antimicrob. Agents* 12 (1999) 11.
- [18] S. Vladimirov, Z. Fiser, D. Agbaba, D. Zivanov-Stakic, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (1995) 675.
- [19] S.M. Hassan, S.M. Amer, M.M. Amer, *Spectrophotometry Analyst* 112 (1987) 1459.
- [20] S. Agbaba, O. Grozdanovic, L. Popovic, S. Vladimirov, D. Zivanov- Stakic, *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC* 9 (1996) 116.

- [21] R. Gatti, R. Gotti, D. Bonazzi, V. Cavrini, *Farmaco* 51 (1996) 115.
- [22] A.H. Hikal, A. Shibl, S. El-Hoofy, *J. Pharm. Sci.* 71 (1982) 1297.
- [23] B. Simončič, M. Kert, *Dyes Pigments* 54 (2002) 221.
- [24] I. Casero, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Talanta* 45 (1997) 167.
- [25] M. Sarkar, S. Poddar, *J. Colloid Interf. Sci.* 221 (2000) 181.



**Capítulo 2. Determination of cationic
surfactants in pharmaceuticals based on
competitive aggregation in ternary
amphiphile mixtures**



ACA, 2006, 577, 257-263

Determination of cationic surfactants in pharmaceuticals based on competitive aggregation in ternary amphiphile mixtures

Esther María Costi, María Dolores Sicilia, Soledad Rubio, Dolores Pérez-Bendito*

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Córdoba, Edificio Anexo Marie Curie.
Campus de Rabanales, 14071 Córdoba, Spain

Received 17 April 2006; received in revised form 15 June 2006; accepted 19 June 2006. Available online 27 June 2006

Abstract

The surfactant to dye binding degree (SDBD) method was extended for the first time to the determination of cationic amphiphiles. For this purpose, Cresyl Violet (CV) and sodium dodecylsulphate (SDS) were selected as dye and reactant surfactant, respectively. This chemical system was used for the determination of cationic surfactants in pharmaceuticals. The approach was based on the competition established between the dye and cationic analytes to form mixed aggregates with the anionic surfactant (SDS–CV and SDS–analyte), which resulted in an increase of the amount of SDS required to reach a given SDS–CV binding degree. The feasibility of the proposed method to determine quaternary ammonium surfactants belonging to different structural groups (alkyldimethylbenzylammonium chlorides, alkyltrimethylammonium bromides and alkyipyridinium chlorides) in a wide variety of pharmaceutical formulations (solutions, creams and powders) was proved. The analytical features of the SDBD method (versatility, high precision and selectivity, ruggedness, rapidity, simplicity and low cost)

made it an advantageous alternative to the conventional methods used in cationic surfactant quality control.

Keywords: Cationic surfactants; Competitive aggregation; Dye–surfactant aggregates; Surfactant–surfactant aggregates

1. Introduction

The analysis of active pharmaceutical ingredients (APIs) is a key step in pharmaceutical production. Analytical methods developed for this aim have been traditionally based on the monomeric properties of these ingredients, so the most appropriate methodology for each application has been dictated by the physical/chemical properties of the involved APIs. Today, demands for improved pharmaceutical productivity and quality encourage the development of more widely applicable analytical methodologies which provide the required response in a simple, rapid and low cost way.

Recently, our research group has proposed a general approach, the surfactant to dye binding degree (SDBD) method [1–5], for the analysis of active pharmaceutical ingredients. The general applicability of the SDBD method for this purpose is based on two concepts: first, most of the APIs are amphiphilic in order to penetrate cells and tissues and to favour interaction of drug molecules with receptor sites and, secondly, analytical measurements are based on an aggregation parameter which is a general property of amphiphiles.

The SDBD method [1] is founded on the competition established between an ionic dye and an amphiphilic compound (analyte) to interact with an ionic surfactant (reactant surfactant) bearing opposite charge to that of the dye. Two types of mixed aggregates are simultaneously formed: dye–reactant surfactant and analyte–reactant surfactant aggregates. The aggregation parameter measured is the amount of reactant surfactant required to reach a given dye–reactant surfactant binding degree, which is a function of the analyte concentration. Analytical signals are obtained by the changes in the spectral characteristics of the dye in the presence of the reactant surfactant.

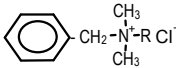
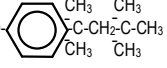
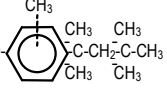
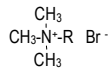
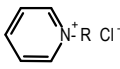
To date, the SDBD method has been successfully used for the quality control of anionic and neutral APIs. The chemical system proposed for this purpose was made up of the anionic dye Coomassie Brilliant Blue G (CBBG) and the cationic surfactant didodecyldimethylammonium bromide (DDABr). A number of APIs including phenamic acids [2], benzoic and benzene sulphonic acid derivatives, polyhydroxybenzenes [3], salicylates [3,4] propionic and acetic acids, indolines, glycyrrhetic acid derivatives, oxicams, pyrazolones, hydrocortisones [4] and fusidane antibiotics [5] have been determined in a variety of pharmaceutical preparations (tablets, capsules, effervescent

granulates, suppositories, solutions, gels, ointments and creams). Benefits obtained with this general applicable methodology included high selectivity, rapidity, simplicity and low cost.

This work was intended with the aim of extending the SDBD method to the determination of cationic APIs, which comprise a wide number of substances with a variety of structures [6]. Several requirements should be fulfilled for the implementation of the SDBD method, namely, the dye should not interact with analytes and have appropriate spectral characteristics, which should be modified by interaction with the reactant surfactant, and, reactant surfactant–analytes interactions should be strong enough to modify the dye–surfactant reactant binding degree.

The analytes selected to perform this study were quaternary ammonium surfactants belonging to different structural groups: alkyldimethylbenzylammonium chlorides, alkyltrimethylammonium bromides and alkylpyridinium chlorides (cationic surfactants tested and their molecular structures are given in Table 1) widely used as antiseptic and contraceptive agents in a wide variety of pharmaceutical formulations. Sodium dodecylsulphate (SDS) was selected as reactant surfactant to provide attractive electrostatic, beside of hydrophobic interactions, with analytes. Cresyl Violet (CV) was the dye used in this study. SDS has been reported [7] to interact with this cationic dye changing its spectral features. SDS–CV and SDS–cationic surfactant interactions were studied from absorbance and light scattering measurements, respectively. Experimental variables affecting the SDBD method, the analytical features of the proposed analytical approach and its feasibility for quantifying quaternary ammonium surfactants in pharmaceutical preparations were evaluated.

Table 1. Structures of cationic surfactants tested

Structural group	General formula	Cationic surfactant	R
Alkyldimethylbenzylammonium chloride		Dodecylbenzalkonium chloride	$-(\text{CH}_2)_{11}-\text{CH}_3$
		Cetalkonium chloride	$-(\text{CH}_2)_{15}-\text{CH}_3$
		Benzethonium chloride	$-(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}$ 
		Methylbenzethonium chloride	$-(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}$ 
Benzalkonium chloride (mixture of alkyldimethylbenzylammonium chlorides)			$-\text{C}_8\text{H}_{17}$ to $-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$
Alkyltrimethylammonium bromide		Cetrimonium bromide	$-(\text{CH}_2)_{15}-\text{CH}_3$
		Cetrimide (mixture of alkyltrimethylammonium bromides)	$-(\text{CH}_2)_{15}-\text{CH}_3$ to $-(\text{CH}_2)_{11}-\text{CH}_3$
Alkylpyridinium chloride		Cetylpyridinium chloride	$-(\text{CH}_2)_{15}-\text{CH}_3$

2. Experimental

2.1. Apparatus

The titration equipment used consisted of a Metrohm 794 Basic Titrino titrator furnished with a 20-mL autoburet, a fan stirred and a titration vessel. The detection unit was a Metrohm 662 spectrophotometer equipped with an immersion probe (1 cm path length). A computer made up of a Pentium 4 processor, a Microsoft Windows XP operating system and a Metrohm TiNet 2.5 Light software was used for the instrument control and data processing. For optimization studies, a Deward titration vessel thermostated by means of circulating water (temperature uncertainty = $\pm 0.1^\circ \text{C}$) was used to control the temperature of the titration medium. Chemical interactions between amphiphiles were studied using a Hitachi U-2000 spectrophotometer.

2.2. Reagents

All chemicals were highest-grade reagents which were used as supplied. A 0.34 mM aqueous solution of Cresyl Violet was prepared by dissolving 80.3 mg of

Cresyl Violet acetate (Aldrich) in 0.5 L of distilled water with sonication for 20 min. This solution was stable for at least 1 month. Sodium dodecyl sulphate (Aldrich, 1 mM) was prepared in distilled water. Stock solutions (1 mM) of the cationic surfactants dodecylbenzalkonium chloride, benzethonium chloride (Fluka), cetalkonium chloride, methylbenzethonium chloride, cetrimonium bromide, cetrimide (Sigma), benzalkonium chloride (Merck) and cetylpyridinium chloride (Serva) were also prepared in distilled water. These solutions were stable for at least a week.

2.3. Determination of cationic surfactants in pharmaceuticals

2.3.1. Sample preparation

The pharmaceutical samples analysed (solutions, creams and powders) and their compositions are given in Table 3. Solutions were diluted with water without further treatment; these diluted solutions contained ca. 350 mg L⁻¹ of cationic surfactant. For the analysis of creams and powders, an amount of sample containing about 10 mg of cationic surfactant was accurately weighed and dissolved in about 40 mL of distilled water (cream) or ethanol (powders) with magnetic stirring for 2 h. If any insoluble material was present in the solution after this treatment, it was removed by filtration and washed several times with distilled water (cream) or ethanol (powders). Aqueous and ethanol solutions were made up to 50 mL and aliquots of these sample solutions were analysed as described below.

2.3.2. Titration procedure

In a 25-mL volumetric flask were placed, in sequence, 2.0 mL of 0.34 mM CV solution, appropriate volumes of the standard or treated pharmaceutical sample solution to give a final cationic surfactant concentration between about 2 and 80 mg L⁻¹, and distilled water to the mark. This solution was placed in a 50-mL titration vessel and titrated with 1.0 mM SDS delivered from the burette at a rate of 10 mL min⁻¹. The stirring rate was set at 700 rpm. Titration curves were obtained by recording the absorbance at 580 nm as a function of the titrant volume.

2.3.3. Calibration

Calibration graphs were constructed on the basis of Eq. (1):

$$m_S^* - m_S = \beta_A m_A \quad (1)$$

where m_S^* and m_S are the amounts of SDS, expressed as a molar concentration, need to obtain a given SDS–CV binding degree, in the presence and the absence of cationic surfactant, respectively; m_A the concentration of analyte, and β_A is the binding degree of SDS to cationic surfactant.

Linear calibrations (see Table 2) were obtained by plotting the parameter $m_S^* - m_S$ as a function of the concentration of cationic surfactant. The m_S^* and m_S values were calculated from the volumes of SDS consumed in titrations performed in the absence (V_S) and presence (V_S^*) of cationic surfactant (Fig. 1).

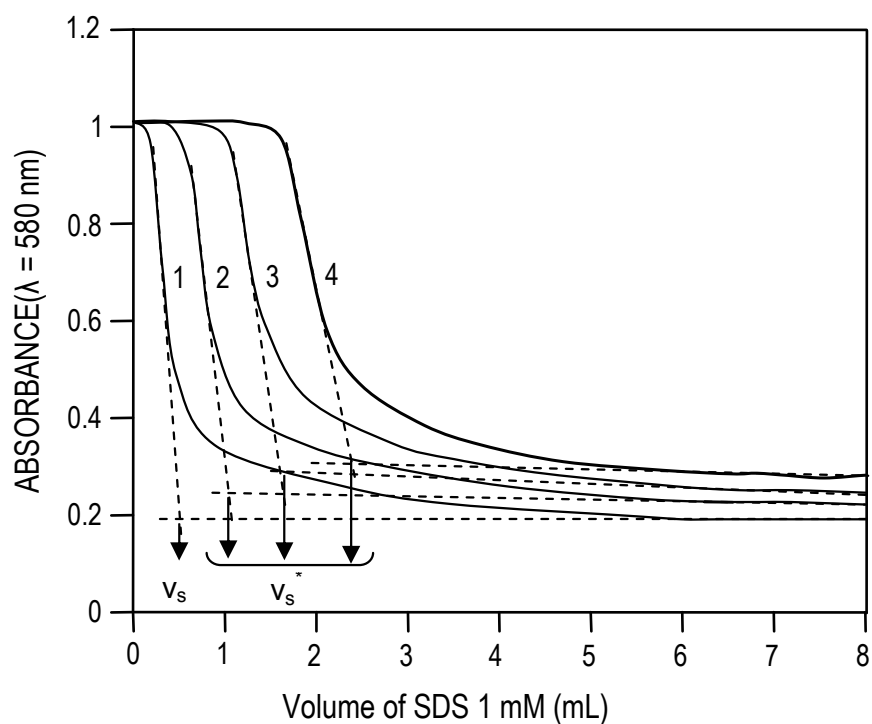


Fig. 1. Variation of the absorbance of CV (27 μM) at 580 nm as a function of the volume of titrant (1 mM SDS) added to a titration vessel containing non-cationic surfactant (1), or cetalkonium chloride concentration of (2) 10 mg L^{-1} , (3) 20 mg L^{-1} and (4) 30 mg L^{-1} .

Table 2. Analytical figures of merit of the proposed method for the determination of cationic surfactants

Cationic surfactant	Detection limit ^a (mg L ⁻¹)	Linear concentration range ^b (mg L ⁻¹)	Intercept ± s (µM)	Slope ± s (µM L mg ⁻¹)	r ^c	S _{yx} ^d	β _A
Dodecylbenzalkonium chloride	0.8	2.7 - 80	0.4 ± 1.9	2.18 ± 0.05	0.997	5.0	0.84 ± 2.02
Cetalkonium chloride	0.8	2.7 - 50	0.6 ± 1.7	2.13 ± 0.07	0.996	3.9	0.84 ± 0.03
Benzethonium chloride	1.0	3.2 - 80	-3.0 ± 3.0	1.79 ± 0.06	0.996	6.4	0.80 ± 0.03
Methylbenzethonium chloride	1.0	3.2 - 80	-2.6 ± 2.7	1.78 ± 0.03	0.998	3.4	0.82 ± 0.02
Benzalkonium chloride	0.8	2.7 - 80	0.8 ± 1.6	2.17 ± 0.04	0.998	3.5	0.79 ± 0.02
Cetrimonium bromide	0.7	2.4 - 50	0.7 ± 0.6	2.49 ± 0.02	0.9997	1.2	0.91 ± 0.01
Cetrimide	0.6	2.0 - 50	2.1 ± 2.0	2.93 ± 0.03	0.9996	1.7	0.90 ± 0.01
Cetylpyridinium chloride	0.7	2.4 - 50	-1.1 ± 1.0	2.36 ± 0.03	0.9994	1.7	0.84 ± 0.02

^a Calculated as three-fold the standard deviation of ms.^b Quantification limit calculated as 10-fold the standard deviation of ms.^c Correlation coefficient, n = 11.^d Standard error of estimate

3. Results and discussion

3.1. Study of chemical interactions in ternary aqueous SDS–CV–cationic surfactant mixtures

Because the application of the SDBD method requires the simultaneous and independent formation of two types of aggregates (reactant surfactant–dye and reactant surfactant–analyte) and that binding energies for the interaction of reactant surfactant and analyte are strong enough to modify the binding degree of reactant surfactant–dye aggregates, we studied the chemical interaction yield in the aqueous ternary mixture made up of Cresyl Violet (dye), sodium dodecylsulphate (reactant surfactant) and cationic surfactants (analytes).

3.1.1. Formation of SDS–CV mixed aggregates

The formation of reactant surfactant–dye mixed aggregates was investigated from changes in the spectral features of the dye. In aqueous solution, CV exhibited a maximum absorption peak at 580 nm (Fig. 2A, curve 1). The addition of SDS, at concentrations far below its critical micelle concentration (CMC), to an aqueous CV solution caused an important decrease in the absorbances measured for the dye between 510 and 620 nm and increased absorbances in the intervals 450–510 and 620–700 nm (compare curves 1 and 2 in Fig. 2A).

From the plot of the variation of the absorbance at three wavelengths 490, 580 and 645 nm as a function of the $[SDS]/[CV]$ molar ratio, the formation of well-defined stoichiometry SDS–CV aggregates was observed. Experiments were performed by mixing increasing SDS concentrations within the range of analytical interest (0–100 μM) and a constant concentration of CV (27 μM). As an example, the results obtained at 490 nm are shown in Fig. 2B. The broken line obtained indicated the formation of SDS–CV aggregates of stoichiometries between 1:5 and 2:1 as the SDS concentration increased. These stoichiometries were confirmed from results obtained at 580 and 645 nm. Surfactant–dye aggregates with a stoichiometry of 4:5 were detected in the end-point of the titration curves under the recommended experimental conditions (Section 2.3.2).

No change in the absorbance of CV was observed under the addition of cationic surfactants which confirmed that dye and analytes did not form mixed aggregates.

3.1.2. Formation of SDS–cationic surfactant mixed aggregates

Surfactants with hydrophilic groups bearing charges of opposite sign are known to strongly interact to form mixed aggregates at concentrations far below their respective critical micelle concentrations (CMCs) [8]. The formation of SDS–cationic surfactant aggregates was studied by measuring the light scattering of aqueous solutions containing a constant concentration of cetalkonium chloride (100 μM) and concentrations of SDS in the interval 0–116 μM . In order to obtain reproducible measurements, spectra were recorded at a fixed time (20 min) after mixing. Increased absorbances measured in the UV region were observed at SDS concentrations higher than about 15 μM , as a result of the formation of anionic–cationic mixed aggregates (compare curve 1 with curves 2 and 3 in Fig. 3A) (CMCs of SDS and cetalkonium chloride 8.0 [9] and 0.5 mM [10], respectively). Fig. 3B shows the plot of the absorbance measured at 240 nm for aqueous SDS–cetalkonium chloride mixtures as a function of the [SDS]/[cetalkonium chloride] molar ratio. The broken line obtained indicated the formation of SDS–cetalkonium chloride aggregates with anionic:cationic surfactant stoichiometries between 1:5 and 1:1.

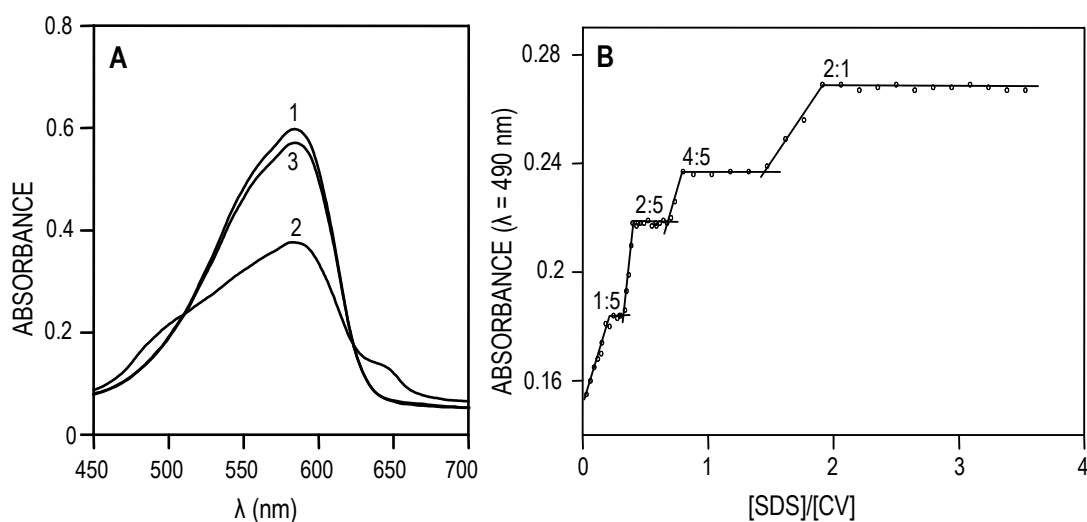


Fig. 2. (A) Spectra for CV (27 μM) (1) in the absence and the presence of: (2) 14 μM SDS and (3) 14 μM SDS and 38 μM cetalkonium chloride. (B) Variation of the absorbance of CV (27 μM) at 490 nm as a function of the [SDS]/[CV] molar ratio.

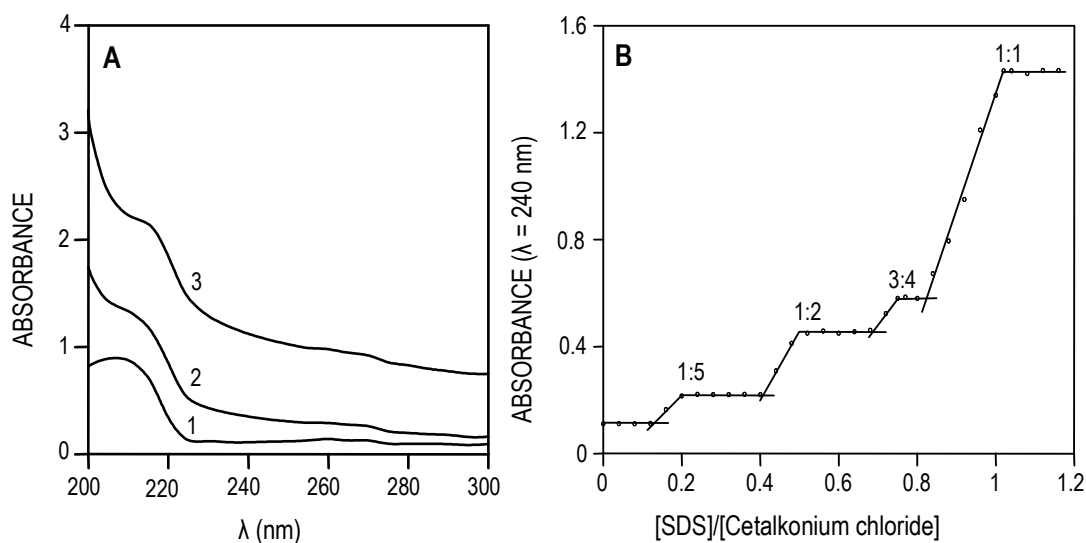


Fig. 3. (A) Spectra for cetalkonium chloride (100 μM) in (1) the absence and (2, 3) the presence of SDS (2) 50 μM and (3) 100 μM . (B) Variation of the absorbance of cetalkonium chloride (100 μM) at 240 nm as a function of the $[\text{SDS}]/[\text{cetalkonium chloride}]$ molar ratio.

3.1.3. Competitive self-assembly in ternary aqueous SDS–CV–cationic surfactant mixtures

The addition of cationic surfactant at concentrations in the μM level to aqueous solutions containing mixed SDS–CV aggregates caused a decrease in the SDS–CV binding degree, as could be inferred by comparing spectra obtained for aqueous anionic surfactant–dye mixtures in the absence (curve 2 in Fig. 2A) and the presence of cationic surfactant (curve 3 in Fig. 2A). This could be explained on the basis of the formation of mixed SDS–cationic surfactant aggregates. The SDS–analyte interaction was strong enough to modify the SDS–CV binding degree, so, the SDS–CV chemical system meets the requisites of the SDBD method for the determination of quaternary ammonium salts.

Fig. 1 shows typical experimental titrations curves obtained by measuring the variation of the absorbance of CV at 580 nm as a function of the volume of 1 mM SDS added to the titration vessel in the absence (curve 1) and the presence of variable cationic surfactant concentrations (2–4). In the presence of analyte, an increase in the amount of SDS required for the formation of SDS–CV aggregates was observed (compare the first region in titrations curves 1–4). Anionic surfactant–dye aggregates began to be detected

at a [SDS]/[cetalkonium chloride] molar ratio of about 0.5 in the whole cationic surfactant concentration range tested (25–75 μM). From these results, it could be inferred that SDS–cationic surfactant with a stoichiometry 1:2 SDS–cationic should be totally formed before SDS and CV begin to interact. This is an evidence that the interaction between SDS and cationic surfactant is favoured respect to that between the anionic surfactant and the dye.

At the titration end point, SDS–cationic surfactant binding degrees comprised between 0.8 and 0.91 were obtained for the different cationic surfactant tested (see Table 2) which denoted the formation of mixed anionic–cationic aggregates with stoichiometries 3:4 and 1:1.

3.2. Optimization

The effect of different variables (concentration of dye, electrolyte and organic solvents, pH and temperature) on m_s , m_s^* and the measurement parameter ($m_s^* - m_s$) was investigated to find the optimum experimental conditions for the determination of cationic surfactants. The study was performed by changing each experimental variable in turn while keeping all other constants and selecting the experimental conditions which provided the highest possible sensitivity in the determination of cationic surfactant and the highest possible precision in determining the titration end-point. Cetalkonium chloride was the cationic surfactant selected to carry out this study.

The influence of the CV concentration was studied over the interval 7–30 μM . At lower dye concentrations, the absorbance decrease as a function of the SDS concentration was very small, which prevented the precise determination of the end-point of the titration curves. Results obtained are shown in Fig. 4A. The m_s value decreased as the dye concentration increased up to about 18 μM , and it was kept nearly constant at higher dye concentration (Fig. 4A2). To explain this atypical behaviour (usually m_s increases as the dye concentration does [1-5]) we must consider that $m_s = \text{SDS} - \text{CV} (4:5) + \text{SDS}_{\text{monomers}}$. The amount of SDS forming SDS-CV aggregates obviously increases when the CV concentration does. So, $\text{SDS}_{\text{monomers}}$ should significantly decrease as the dye concentration increases. It is known that dyes bearing opposite charge to that of surfactant molecules greatly decrease the critical concentration for surfactant aggregation [11]). The decrease of the m_s^* value as a function of the dye concentration was lesser pronounced than that of the m_s value (Fig. 4A2); as a result, an increase in the measurement parameter was observed at CV concentrations up about 15 μM (Fig. 4A1).

A 27 μM CV concentration was selected as an optimum value to ensure maximum sensitivity and precision.

The pH did not affect the amount of SDS required to form SDS–CV aggregates in the interval 2.0–9.0, both in the absence and presence of cationic surfactant. At higher pH values, SDS caused very small modifications in the spectral features of CV so, the titration curves obtained did not permit a reproducible measurement. Because of the wide pH interval in which the analytical signal was kept constant, no adjustment of the pH of standard or pharmaceutical sample solutions was required.

The electrolyte effect was investigated by adding sodium chloride to the titration vessel at concentrations between 0 and 1 M. Both m_s and m_s^* values and the measurement parameter remained constant over the all electrolyte concentration range studied.

The influence of the temperature was studied between 5 and 60 °C. Increased temperatures disfavoured the formation of CV–SDS aggregates in both the absence and presence of cationic surfactants, this effect being much more pronounced at temperatures higher than about 40 °C (Fig. 4B2). However, no influence of this variable on the sensitivity achieved for the determination of cetalkonium chloride was observed in the whole interval studied (Fig. 4B1). Measurements were performed at room temperature.

Ethanol was the organic solvent used to extract cationic surfactants from some solid pharmaceutical samples (i.e., powders) and it was the main component of some bactericide solutions analyzed (e.g. Alcohol Reforzado JVF, Alcohocel 70° and Alcohol 96° Cuve), so its effect on m_s , m_s^* and the measurement parameter was investigated in the range 0–20%. The results obtained are depicted in Fig. 4C. Ethanol increased the m_s and m_s^* values in proportions higher than 5% (Fig. 4C2); organic solvents are known to disfavour molecular aggregation because of their ability to break down the structured water molecules around the hydrophobic parts of molecules [12], which hinders hydrophobic interactions between them. At ethanol concentrations higher than 10%, the alcohol disfavoured the formation of SDS–cetalkonium chloride aggregates in a higher extent than SDS–CV aggregate formation, which resulted in a decrease in the measurement parameter (Fig. 4C1).

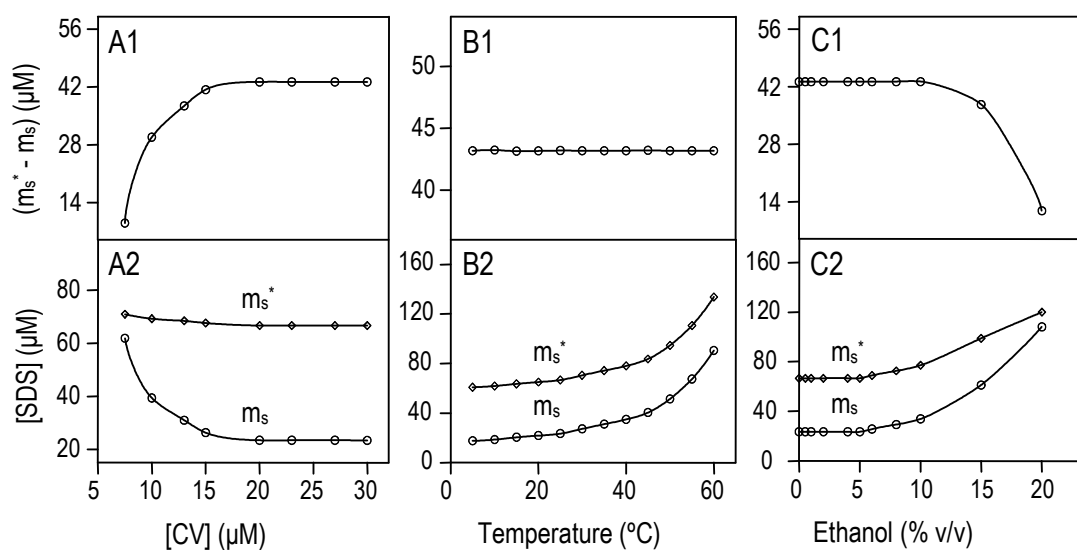


Fig. 4. Influence of (A) CV concentration, (B) temperature and (C) the ethanol content on (1) the measurement parameter and (2) m_s^* and m_s . [Cetalkonium chloride] = 20 mg L⁻¹; (B and C) [CV] = 27 μM.

3.3. Analytical features

Calibration graphs [$(m_s^* - m_s)$ versus m_A] were run for cationic surfactants with different molecular structures: alkyldimethylbenzylammonium chlorides (dodecylbenzalkonium, cetalkonium, benzethonium, methylbenzethonium and benzalkonium chlorides), alkyltrimethylammonium bromides (cetrimonium bromide and cetrimide) and cetylpyridinium chloride. Table 2 shows the figures of merits of the calibration graphs obtained. Linear calibration graphs with intercepts values not significantly different from zero were obtained in all cases [the standard error of the estimate and the correlation coefficient varied over the ranges 1.2–6.4 and 0.996–0.9997, respectively]. Therefore, the results obtained for the cationic surfactants tested fitted to Eq. (1) and the analyte–SDS binding degree (β_A) was kept constant over the linear concentration range. This parameter could be easily calculated from the slopes of the calibration graphs obtained for each cationic surfactant, taking into account their molecular weights. The values obtained for the degree of binding of the cationic surfactants essayed to the anionic surfactant SDS at the titration end-point are shown in Table 2. Similar β_A values were obtained for cationic surfactants with very different hydrophobic moieties, which indicated that attractive electrostatic interactions between

hydrophilic groups bearing opposite charges were the main driving forces for mixed aggregate formation, although hydrophobic interactions also occurred.

The precision of the proposed method, expressed as relative standard deviation, was 1.1% ($n = 11$) for a concentration of cetalkonium chloride of 20 mg L^{-1} .

3.4. Determination of cationic surfactants in pharmaceutical preparations

The suitability of the SDBD method for quantifying cationic surfactants in pharmaceutical formulations was studied by determining benzethonium chloride, benzalkonium chloride and cetylpyridinium chloride in liquid (solutions) and solid (creams and powders) samples. The results obtained for nine commercially available formulations are shown in Table 3. In all cases, both the nominal and found values were quite consistent. This demonstrated the high selectivity of the proposed method; no interference from other active ingredients or excipients occurred (see the composition of pharmaceutical formulations in Table 3) when pharmaceutical samples were analyzed after dilution of liquid samples or dissolution of solid samples.

4. Conclusions

The analytical approach based on competitive self-assembly in ternary SDS–CV–cationic surfactant aqueous mixtures permits the accurate determination of quaternary ammonium surfactants in pharmaceutical formulations with the precision required in quality control. The sensitivity (detection limits between 0.6 and 1.0 mg L^{-1}) and precision (relative standard deviations for the whole analytical process in the interval 0.8 – 1.7%) of this new aggregation parameter-based approach are comparable to those provided by monomer based methods, but, it surpasses them in terms of: (1) versatility; cationic surfactants belonging to different structural groups (alkyldimethylbenzylammonium chlorides, alkyltrimethylammonium bromides and alkyl pyridinium chlorides) can be determined in a wide variety of pharmaceutical formulations (solutions, creams and powders). (2) Selectivity; pharmaceutical formulations can be directly analyzed after dissolution of samples. Monomer-based methods often require the separation of the target analytes from other matrix components [13–15]. (3) Ruggedness; the analytical response is kept constant for a wide range of experimental conditions (i.e., pH values between 2 and 9 and ionic strength up to 1 M). (4) Rapidity; because of the

minimum sample treatment required and the speed of the determination step. (5) Simplicity; measurements are based on a photometric titration. (6) Low cost in both instrumentation (photometric titrator) and reagents.

This research extends the SDBD method to the analysis of cationic active pharmaceutical ingredients and proves that it is a general valuable strategy for APIs quality control.

Table 3. Determination of cationic surfactants in pharmaceutical preparations

Cationic surfactant	Commercial formulation ^a	Cationic surfactant concentration	
		Nominal value	Found ^b
Benzalkonium chloride	Ginejuvent (solution)	10 g L ⁻¹	9.92 (0.08) g L ⁻¹
	Crema Contraceptiva Lanzas (cream)	12 mg g ⁻¹	11.8 (0.2) mg g ⁻¹
	Alcohol Reforzado JVF (solution)	1 g L ⁻¹	1.005 (0.009) g L ⁻¹
	Lindemil (solution)	6 g L ⁻¹	5.95 (0.08) g L ⁻¹
	Resorborina (solution)	1 g L ⁻¹	0.99 (0.01) g L ⁻¹
	Cetylpyridinium chloride	Alcohocel 70° (solution)	0.5 g L ⁻¹
	Alcohol 96° Cuve (solution)	1 g L ⁻¹	1.00 (0.01) g L ⁻¹
	Silidermil (powder)	5 mg g ⁻¹	4.99 (0.06) mg g ⁻¹
Benzethonium chloride	Isdinex (powder)	0.6 mg g ⁻¹	0.605 (0.007) mg g ⁻¹

^a Composition of commercial formulations: Ginejuvent (Juventus, Spain): lactic acid, 2% (w/v); calcium lactate, 2% (w/v) and other excipients (menthol, camonile, etc) Crema Contraceptiva Lanzas (Ipsen, Spain): excipients (citric acid, stearate glycol, polyglycols and lavender essence), 98.8% (w/w). Alcohol reforzado JVF (Betamadrileño laboratories, Spain): ethanol, 96% (v/v). Lindemil (Abbott, Spain): aluminium potassium sulphate, 8% (w/v) and others excipients (methylene blue, menthol, eucalyptol methyl salicylate, etc), 91.4% (w/v). Resorborina (Rifamar, Spain): tetracaine chlorhydrate, 0.02% (w/v); dexamethazone, 0.005% (w/v); resorcinol, 2% (w/v) and excipients (ethanol, glycerol, etc.), 97.9% (w/v). Alcohocel 70° (Perez Gimenez laboratories, Spain): ethanol 70% (v/v). Alcohol 96° Cuve (Perez Gimenez laboratories, Spain): ethanol 96% (v/v). Silidermil (Fides Ecopharma, Spain): dimethicone, 2.5%; zinc oxide, 2% and magnesium silicate, 95% (w/w). Isdinex (Isdin, Spain): diphenhydramine chlorhydrate, 1% and excipients (menthol, zinc oxide and talc), 98.9%.

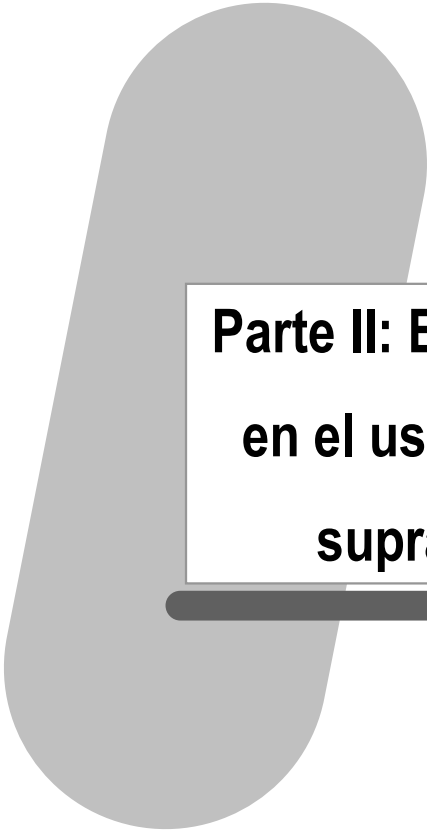
^b Average of six determinations. Standard deviations are given in parentheses.

Acknowledgement

The authors gratefully acknowledge financial support from MEC (Project no. CTQ2005-00643). The first author acknowledges the Andalusian CICYE for a postgrad fellowship.

References

- [1] R. Fabios, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6011.
- [2] A. Pedraza, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 522 (2004) 89.
- [3] A. Pedraza, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Analyst* 130 (2005) 1102.
- [4] A. Pedraza, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Analyst* 131 (2006) 81.
- [5] E.M. Costi, M.D. Sicilia, S. Rudio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 549 (2005) 159.
- [6] J. Reynolds (Ed.), *Martindale Extra Pharmacopoeia*, 31st ed., Pharmaceutical Press, London, 1996.
- [7] V.B. Gawandi, S.N. Guha, K.I. Priyadarsini, H. Mohan, *J. Colloid Interface Sci.* 242 (2001) 220.
- [8] D.N. Rubingh, in: K.L. Mittal (Ed.), *Solution Chemistry of Surfactants*, vol. 1, Plenum Press, New York, 1978, pp. 337–354.
- [9] P.C. Griffiths, N. Hirst, A. Paul, S.M. King, R.K. Heenan, R. Farley, *Lagmuir* 20 (2004) 6904.
- [10] A. González-Pérez, J. Czapkiewicz, J.L. Castillo, J.R. Rodríguez, *Coll. Surf. A Physicochem. Eng. Aspects* 71 (2001) 129.
- [11] I. Casero, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Talanta* 45 (1997) 167.
- [12] S. Bračko, J. Špan, *Dyes Pigments* 50 (2001) 77.
- [13] T. Sakai, A. Hirose, *Talanta* 59 (2003) 167.
- [14] J.S. Wang, J.R. Lu, L.X. Zhang, Y.Z. Hu, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 381.
- [15] R.B. Taylor, S. Toasaksiri, R.G. Reid, D. Wood, *Analyst* 122 (1997) 973.



**Parte II: Extracción basada
en el uso de disolventes
supramoleculares**

1. OBJETO

El uso masivo y descontrolado de antibióticos en medicina veterinaria origina serios problemas de salud pública. Con el fin de evitar estos problemas se han establecido límites máximos de residuos (LMRs) de principios activos en productos de consumo de origen animal. Para controlar el cumplimiento de la legislación vigente y evaluar la exposición de los consumidores a estos residuos es necesario disponer de métodos analíticos que proporcionen resultados de calidad, sean simples, robustos, de bajo costo y de fácil implementación en los laboratorios de análisis de alimentos.

El objetivo de las investigaciones que se presentan en la segunda parte de esta Memoria ha sido desarrollar una metodología general para el tratamiento de muestras de alimentos de origen animal, concretamente pescados de piscifactoría y carnes, que permita la determinación de antibióticos del grupo de las quinolonas y de las sulfonamidas en este tipo de muestras con la exactitud y precisión requeridos para el control de la calidad de productos de consumo. La metodología propuesta se basa en la microextracción de los analitos en un disolvente supramolecular y su posterior determinación mediante cromatografía líquida con detección fluorimétrica. El disolvente supramolecular utilizado se sintetiza mediante la coacervación inducida por agua de micelas inversas de ácido decanoico en tetrahidrofurano. Las características más destacables de la metodología desarrollada son:

- 1) La síntesis del disolvente supramolecular es simple, económica y al alcance de cualquier laboratorio.
- 2) La concentración de ácido decanoico en el coacervado es muy elevada ($\sim 0,76 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$), lo que permite realizar la extracción de los analitos con bajos volúmenes de disolvente supramolecular y obviar la etapa de evaporación del extractante, generalmente necesaria cuando se utilizan otras metodologías de extracción para alcanzar los límites de cuantificación requeridos (inferiores al LMR establecido para cada analito en cada alimento).
- 3) El disolvente supramolecular es compatible con cromatografía de líquidos y detección fluorescente.

- 4) Las cantidades de muestra usadas para el análisis son generalmente pequeñas lo que facilita su tratamiento.

A continuación se describen los aspectos más importantes de la extracción con disolventes supramoleculares, y los principales resultados obtenidos en las investigaciones realizadas en esta Tesis Doctoral para el desarrollo de métodos de extracción de residuos de drogas de uso veterinario y piscícola en alimentos.

2. DISOLVENTES SUPRAMOLECULARES

2.1. Formación del disolvente supramolecular. Fenómeno de coacervación.

Los disolventes supramoleculares se forman a partir de disoluciones de macromoléculas o estructuras macromoleculares mediante un proceso de coacervación. El fenómeno de la coacervación fue descrito por primera vez por los químicos holandeses Bungenberg de Jong y Kruyt en 1930. Desde entonces, las investigaciones sobre coacervados han tenido grandes discontinuidades, con décadas de relativa inactividad. Como hito relevante cabe destacar que en la década de los 70, el bioquímico ruso Oparin propuso que la vida se inició en gotas de coacervados. La información disponible a día de hoy sobre esta temática se encuentra dispersa en su mayor parte en trabajos de investigación sobre química coloidal, química de polímeros, fisico-química, o en estudios realizados por la industria farmacéutica y alimentaria.

De acuerdo con la definición de la IUPAC, la coacervación consiste en la separación de sistemas coloidales en dos fases líquidas [1]. A la fase más concentrada en el componente coloidal se le denomina coacervado o, más recientemente, disolvente supramolecular y la otra fase, con muy baja concentración en este componente, se denomina fase en equilibrio. Un disolvente supramolecular es por definición, inmisible en el disolvente de la disolución a partir de la que se forma. Las macromoléculas que experimentan coacervación son proteínas (gelatina, β -lactoglobulina, caseína, albúmina y glicinina), polisacáridos (goma arábiga, pectina, quitosan y alginato), polímeros sintéticos (acetato de polivinilo, polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulosa, isobutileno-isopropeno, y poli(dialquil)dimetilamonio) y drogas (heparina, gentamicina y morfina). Estructuras macromoleculares formadas a partir de la agregación de compuestos anfífilos (tensioactivos, fosfolípidos y sales biliares) también dan lugar a la formación de disolventes supramoleculares.

Se distinguen dos tipos de coacervación en función del mecanismo a través del cual se produce la separación de fases:

a) Coacervación simple: El componente coloidal es una macromolécula o estructura macromolecular disuelta en agua o en un disolvente orgánico. La coacervación se produce mediante un cambio en el pH o la temperatura, la adición de una determinada cantidad de electrolito, o la adición de un volumen de disolvente, miscible con el primero, pero en el que el componente coloidal es poco soluble. El agente inductor de la coacervación origina una disminución de las interacciones disolvente-macromolécula, favoreciendo la desolvatación de las macromoléculas y, por lo tanto, la interacción entre ellas [2]. Los agregados formados son insolubles y se separan del disolvente produciendo el coacervado.

b) La coacervación compleja: Se produce cuando a disoluciones acuosas de macromoléculas cargadas se le adiciona una macromolécula de signo opuesto [3]. El complejo resultante retiene contraiones y una cantidad considerable de moléculas de disolvente, siendo la solvatación parcial del complejo, una de las razones por la que se obtienen coacervados en lugar de productos insolubles.

La aplicación industrial de mayor interés de los disolventes supramoleculares es la microencapsulación de ingredientes activos en áreas tales como farmacia, agricultura, alimentación y cosmética [4]. El fenómeno de la coacervación también se ha usado para la purificación de proteínas, recuperación de acuíferos contaminados, tratamientos de aguas residuales y en procesos de extracción analítica. En este caso, los disolventes supramoleculares se generan a partir de agregados moleculares de tensioactivos.

2.2. Tipos de disolventes supramoleculares

Se pueden distinguir diferentes tipos de disolventes supramoleculares en función de la naturaleza de los agregados que los constituyen (micelas normales, micelas inversas o vesículas) y de los tensioactivos que forman dichos agregados (tensioactivos sintéticos no iónicos, anfóteros, catiónicos o aniónicos, o biotensioactivos como es el caso de los ácidos alquilcarboxílicos). A continuación comentaremos los aspectos más importantes de cada uno de los tipos de disolventes supramoleculares usados en esquemas de extracción.

2.2.1. Disolventes de micelas de tensioactivos no iónicos

Estos disolventes supramoleculares han sido los más ampliamente utilizados en extracciones analíticas desde que fueron descritos por Watanabe y colaboradores en la década de los setenta [5]. Se forman mediante el aumento de la temperatura de disoluciones acuosas que contienen concentraciones de tensioactivo no iónico superiores a su concentración micelar crítica (cmc). La temperatura a partir de la cual se produce el proceso de coacervación, denominada punto de nube "cloud point, (CP)", varía en función de la estructura molecular del tensioactivo y de su concentración en disolución.

Para una serie homóloga de tensioactivos no iónicos, el CP aumenta a medida que disminuye la longitud de la cadena hidrocarbonada o aumenta el número de unidades oxietileno, siendo el efecto del grupo hidrófilo más pronunciado que el del grupo hidrófobo [6]. Se han propuesto diferentes modelos que permiten estimar el CP de tensioactivos no iónicos en función de sus características estructurales [7-9].

Generalmente, el valor de CP es independiente de la concentración de tensioactivo hasta aproximadamente el 10% (p/v) [7]. A concentraciones mayores, la influencia de esta variable en el valor de CP varía para cada tensioactivo concreto. En la Tabla 1 se muestran los valores de CP para diferentes tensioactivos no iónicos a varias concentraciones de cada uno de ellos.

Finalmente, la adición de sales inorgánicas y de determinados compuestos orgánicos también puede influir en el valor de CP obtenido. La mayoría de los iones inorgánicos originan una disminución del valor de CP, ya que favorecen la formación de la estructura del agua, disminuyendo su capacidad de solvatación y, por lo tanto, la solubilidad del tensioactivo. Este efecto es mayor a medida que aumenta la carga del ión (ej $\text{PO}_4^{3-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{Cl}^-$) [10]. Para cationes monovalentes el efecto disminuye de acuerdo con el orden: $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+ > \text{NH}_4^+$, y para aniones monovalentes: $\text{OH}^- > \text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^-$ [11]. Los aniones que desfavorecen la formación de la estructura del agua (ej. SCN^- y I^-) y los cationes que forman complejos con los tensioactivos no iónicos (ej. Ag^+ y cationes divalentes) aumentan el valor de CP [11]. La influencia de una determinada sal aumenta a medida que aumenta la concentración de la misma en la disolución.

Tabla 1. Variación del valor de "cloud point" para diferentes tensioactivos no iónicos en función de su concentración

Tensioactivo	Concentración (% p/v)	CP (° C)
Alcohol etoxilados: ^aC_nE_m		
C ₆ E ₃	3,0	47
	20,0	45
C ₁₄ E ₇	1,0	58
	5,0	59
Alquilfenol etoxilados		
Triton X-114	0,1	24
	5,0	25
	10,0	30
Triton X-100	0,25	64
	7,0	65
	33,0	76
PONPE 7,5	0,12	1
	5,0	6
	20,0	25
Tensioactivos de silicona		
PEG/PPG-18/18 dimeticona	0,2	41
	2,0	39

^an: número de átomos de C en la cadena hidrocarbonada; m: número de unidades etoxiladas

El efecto de la adición de compuestos orgánicos en el valor de CP varía en función de la naturaleza del compuesto. Los compuestos no polares con cadenas hidrocarbonadas largas, que son solubilizados en el núcleo micelar, producen un aumento del valor de CP, mientras que compuestos polares, como ácidos grasos, alcoholes de cadena corta, fenoles y benceno, que se solubilizan en regiones de la micela más próximas a la superficie micelar, la disminuyen.

2.2.2. Disolventes de micelas de tensioactivos anfóteros

El uso de este tipo de disolventes supramoleculares en procesos de extracción fue propuesta por Saitoh y colaboradores en la década de los 90 [12]. En contraposición a la coacervación de disoluciones de tensioactivos no iónicos, la formación del disolvente supramolecular en disoluciones de tensioactivos anfóteros se produce cuando la temperatura disminuye por debajo de un valor crítico [comparar las regiones correspondientes a la formación de dos fases (L-L) en las Figuras 1A y 1B].

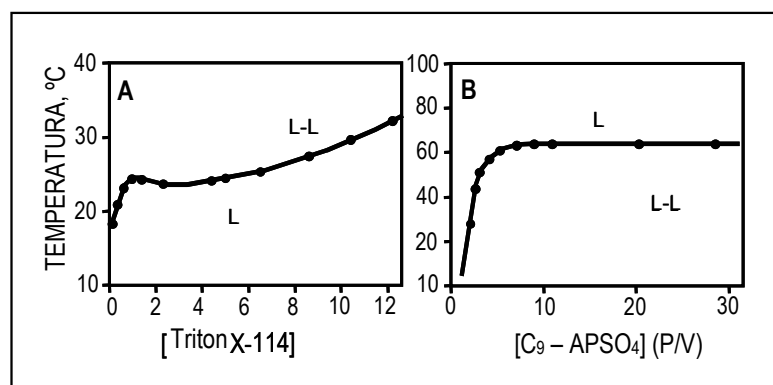


Figura 1. Diagramas de fases para los tensioactivos (A) Triton X-114 (no iónico) y (B) 3-(nonildimetilamonio)propilsulfato (C₉-APSO₄, anfótero).

La temperatura a la que se produce la separación de fases en disoluciones de tensioactivos anfóteros se ve afectada tanto por cambios de pH como por la adición de sales inorgánicas. A valores de pH ácidos, el valor de CP disminuye a medida que lo hace el pH debido a que su grupo sulfato se protona transformándose en un tensioactivo catiónico, y a valores de pH básicos y neutros, esta variable no influye en el CP. El aumento de la fuerza iónica origina un aumento en el valor de CP, al contrario que ocurre para los tensioactivos no iónicos en presencia de la mayoría de las sales.

2.2.3. Disolventes de micelas de tensioactivos catiónicos

La formación de disolventes de micelas de tensioactivos catiónicos se produce en presencia de sales inorgánicas. Las disoluciones de alquat-336 se separan en dos fases líquidas a temperatura ambiente en presencia de Na₂SO₄ a concentraciones superiores a aproximadamente 10 mM [13]. En otros casos, además de la adición de una

sal es necesaria la presencia de un co-tensioactivo para que se produzca el fenómeno de la coacervación. Este es el caso del sistema cetrimida/NaCl en el que sólo se produce separación de fases en presencia del co-tensioactivo 1-octanol [14].

2.2.4. Disolventes de micelas de tensioactivos aniónicos

La adición de ácidos a disoluciones acuosas de tensioactivos aniónicos origina la formación de disolventes supramoleculares constituidos por micelas de estos tensioactivos dispersas en una fase acuosa con un elevado contenido en ácido (>3,0 M). Este fenómeno, descrito por primera vez por nuestro grupo de investigación [15], se produce en disoluciones de tensioactivos pertenecientes a diferentes grupos estructurales (alquil sulfatos, alquil sulfonatos, alquilbenceno sulfonatos y alquil sulfosucinatos) y con diferente longitud de cadena hidrocarbonada (C₁₀-C₁₄) [16] en un amplio intervalo de temperaturas (10-90°C). Dodecilsulfato y dodecilsulfonato sódico han sido los tensioactivos aniónicos más ampliamente utilizados en el desarrollo de esquemas de extracción analítica [17-23]. En la Figura 2 se muestran los diagramas de fases para estos dos tensioactivos.

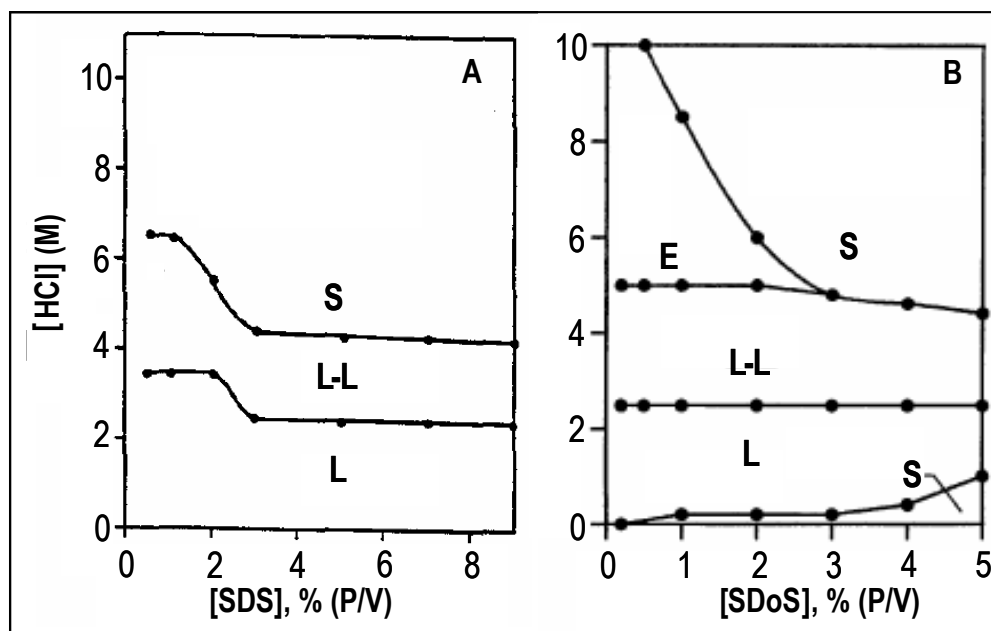


Figura 2. Diagramas de fases concentración de HCl frente a concentración de tensioactivo para (A) dodecilsulfato sódico (SDS) y (B) dodecilsulfonato sódico (SDoS). L: líquido homogéneo, L-L: dos fases líquidas, E: emulsión, S: insolubilización del tensioactivo.

2.2.5. Disolventes de micelas mixtas

Estos disolventes se obtienen a partir de disoluciones acuosas que contienen mezclas de dos tensioactivos no iónicos o mezclas de un tensioactivo no iónico y un tensioactivo iónico (catiónico o aniónico). El CP para mezclas acuosas de dos tensioactivos no iónicos es un valor intermedio entre los valores de CP de ambos tensioactivos [24], mientras que el CP de disoluciones acuosas que contienen un tensioactivo no iónico y un tensioactivo iónico aumenta a medida que aumenta la concentración de tensioactivo iónico en disolución [25]. Esto es debido a que la carga existente en la superficie de las micelas mixtas aumenta la fuerza de repulsión entre micelas y la solubilidad de los agregados en la fase acuosa, desfavoreciendo el proceso de coacervación. A modo de ejemplo en la Figura 3A se muestra la variación de la temperatura crítica para la separación de fases en tres mezclas de tensioactivos no iónicos alquilpolietoxilados en función de la fracción molar de cada tensioactivo en disolución y en la Figura 3B el efecto de la concentración del tensioactivo aniónico dodecilsulfato sódico y del tensioactivo catiónico bromuro de cetiltrimetilamonio en el CP del tensioactivo no iónico Triton X-114.

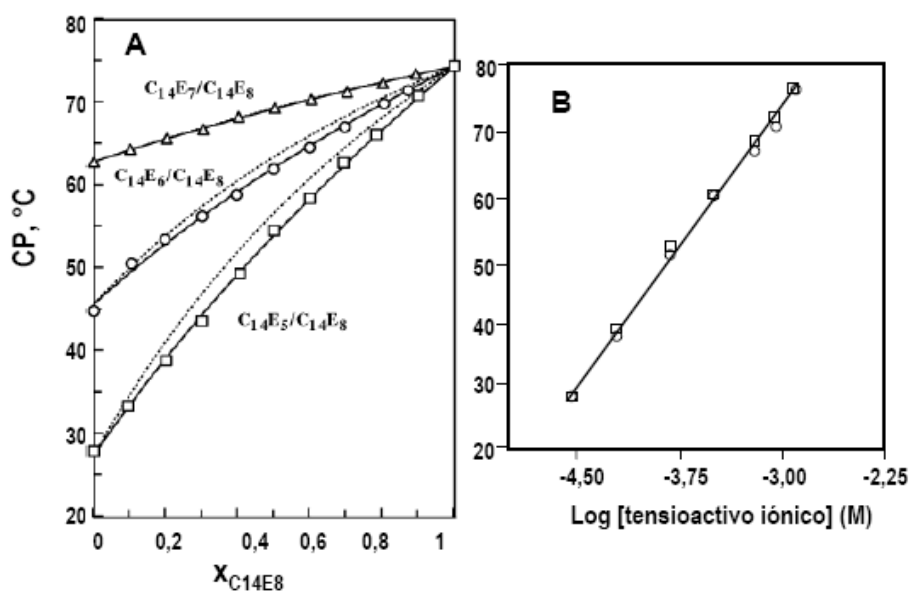


Figura 3. Variación del CP de mezclas acuosas de (A) dos tensioactivos no iónicos alquilpolietoxilados, C_nE_m en función de su fracción molar en disolución (x) y (B) de Triton X-114 en función de la concentración de (□) dodecilsulfato sódico y (○) bromuro de cetiltrimetilamonio.

La adición de electrolitos a disoluciones acuosas que contienen mezclas de tensioactivos no iónicos e iónicos causa una importante disminución del valor de CP. En determinados casos y para concentraciones de electrolito lo suficientemente elevadas, la separación de fase en mezclas acuosas de tensioactivos no iónicos e iónicos se produce a temperaturas incluso menores a las requeridas para el tensioactivo no iónico puro en ausencia de sales [25].

2.2.6. Disolventes de micelas inversas de ácidos alquilcarboxílicos

Los ácidos alquilcarboxílicos con longitudes de cadena comprendidos entre 6 y 18 átomos de carbono forman micelas inversas en una gran variedad de disolventes orgánicos (tetrahidrofurano, acetona, acetonitrilo, etanol, dioxano, etc.). La adición de agua a las disoluciones de micelas inversas de estos biotensioactivos origina la desolvatación de los agregados, favoreciendo las interacciones entre ellos y la formación de micelas inversas de mayor tamaño. Los nuevos agregados formados son insolubles en la mezcla disolvente orgánico-agua y se separan como una segunda fase, obteniéndose el disolvente supramolecular. Este fenómeno, descrito muy recientemente por nuestro grupo de investigación [26], sólo se produce en condiciones en las que el biotensioactivo se encuentra en su forma ácida y, por lo tanto, el pH de la disolución acuosa adicionada como agente coacervante debe ser inferior a aproximadamente 4 [pK_a (R-COOH) = $4,8 \pm 0,2$].

El diagrama de fases obtenido para la mezcla ácido alquilcarboxílico/disolvente orgánico/agua varía en función del disolvente orgánico usado y de la longitud de la cadena hidrocarbonada del biotensioactivo. En la Figura 4A se muestra cómo varía el porcentaje mínimo de disolvente orgánico necesario para que se produzca la coacervación de micelas inversas del ácido decanoico en función de la constante dieléctrica del disolvente orgánico usado. Para disolventes con constante dieléctrica inferior a aproximadamente 25 (ej. tetrahidrofurano), el porcentaje de disolvente orgánico a partir del cual se produce la coacervación es inferior al 5%, aumentando dicho porcentaje exponencialmente a medida que aumenta la constante dieléctrica del disolvente por encima de este valor. En cuanto a la influencia de la longitud de la cadena hidrocarbonada, en la Figura 4B se muestran los diagramas de fases correspondientes a los sistemas tetrahidrofurano/ácido alquilcarboxílico/agua para biotensioactivos con cadena hidrocarbonada saturada con un número de átomos de carbono comprendido entre 8 y 16 (C_8 - C_{16}) y para el ácido oléico (C_{18}). El límite inferior de porcentaje de

tetrahidrofurano para la formación del disolvente supramolecular viene determinado por la solubilidad del biotensioactivo en la mezcla tetrahidrofurano/agua. El mínimo porcentaje de disolvente necesario para la coacervación aumenta a medida que disminuye la solubilidad del ácido alquilcarboxílico en la disolución, es decir a medida que aumenta la longitud de su cadena hidrocarbonada, a excepción del ácido oléico que es líquido a temperatura ambiente. El mínimo porcentaje de agua necesario para que se produzca separación de fases, o lo que es lo mismo, el máximo porcentaje de tetrahidrofurano al que ésta se produce, también varía en función de la longitud de la cadena hidrocarbonada.

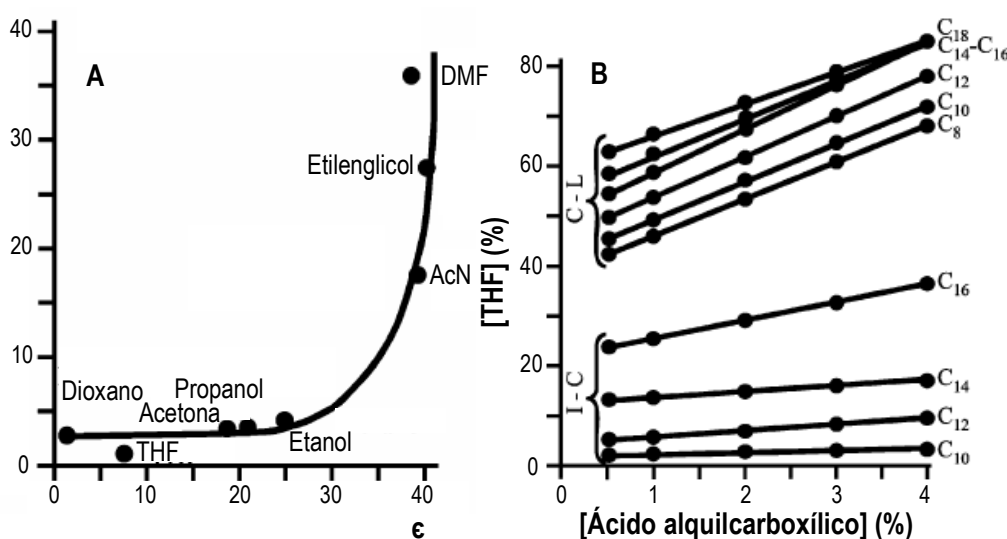


Figura 4. (A) Variación del mínimo porcentaje de disolvente orgánico necesario para la coacervación de disoluciones de ácido decanoico a una concentración del 1% en función de la constante dieléctrica del disolvente. (B) Diagramas de fases para los ácidos alquilcarboxílicos saturados con longitud de cadena de C₈ a C₁₆ y para el ácido oléico (C₁₈). I-C: Límite entre las regiones de formación de suspensión de biotensioactivo en tetrahidrofurano/agua y de formación del disolvente supramolecular. C-L: Límite entre las regiones de formación del disolvente supramolecular y de formación de una única fase líquida homogénea.

2.2.7. Disolventes de vesículas de ácidos alquilcarboxílicos

La coacervación de vesículas de ácidos alquilcarboxílicos con longitudes de cadena hidrocarbonada comprendida entre 8 y 18 átomos de carbono fue descrita por primera vez por nuestro grupo de investigación en 2006 [27]. El disolvente supramolecular se forma a partir de suspensiones acuosas de ácidos alquilcarboxílicos mediante la adición de sales de tetrabutilamonio. La agregación se produce mediante la

formación de puentes de hidrógeno entre los grupos carboxílico y carboxilato de las moléculas de ácido alquilcarboxílico en forma ácida (HAC) y básica (AC⁻), respectivamente, y a través de interacciones de Van der Waal entre las cadenas hidrocarbonadas de dichas moléculas. La cantidad y estabilidad de las vesículas formadas es máxima para una relación de concentraciones molares [HAC]/[AC⁻] igual a 1, condiciones en las que el número de puentes de hidrógeno formados es máximo. El catión tetrabutilamonio neutraliza las cargas negativas de las moléculas de AC⁻ en la superficie de las vesículas, favoreciendo la formación de agregados de gran tamaño, que se separan de la disolución como una segunda fase.

El pH de la disolución es un factor clave en la formación de disolventes de vesículas de ácidos alquilcarboxílicos. La coacervación se produce a valores de pH comprendidos en el intervalo $pK_{a(\text{aparente})} \pm 1$, donde $pK_{a(\text{aparente})}$ es la constante de acidez para un ácido que forma parte de una estructura supramolecular. El valor de $pK_{a(\text{aparente})}$ varía entre aproximadamente 6 y 8,5 para ácidos alquilcarboxílicos con longitudes de cadenas hidrocarbonadas comprendidas entre 8 y 18 átomos de carbono.

2.3. Propiedades de los disolventes supramoleculares

La aplicabilidad de los disolventes supramoleculares en esquemas de extracción analítica viene dada fundamentalmente por su capacidad de solubilización y concentración y su compatibilidad con técnicas de separación cromatográfica y de detección. A continuación comentaremos estas propiedades y otras de interés desde el punto de vista práctico para la implementación de procedimientos de extracción en los laboratorios de análisis.

2.3.1. Capacidad de solubilización y concentración

La capacidad de solubilización de los disolventes supramoleculares depende de la fuerza de las interacciones analito-disolvente y del número de centros de solubilización del disolvente. La fuerza de las interacciones intermoleculares disminuye en el orden: interacciones electrostáticas > enlaces por puentes de hidrógeno > interacciones dipolo-dipolo > fuerzas de Van der Waal. Las interacciones dipolo-dipolo y de Van der Waal se producen en todos los tipos de disolventes supramoleculares, independientemente de su naturaleza. Sin embargo, la solubilización mediante formación de puentes de hidrógeno sólo se produce en disolventes constituidos por tensioactivos con grupos donadores o

aceptores de protones (ej. grupos carboxílico y/o carboxilato en disolventes de micelas inversas o vesículas de ácidos alquilcarboxílicos) y la solubilización mediante interacciones electrostáticas, en disolventes constituidos por micelas de tensioactivos iónicos o de micelas mixtas de tensioactivos no iónicos-iónicos. No obstante, la presencia de elevadas concentraciones de ácidos o sales generalmente necesarias para la coacervación de disoluciones de tensioactivos iónicos disminuye considerablemente la fuerza de las interacciones electrostáticas en este tipo de disolventes. Finalmente, los disolventes de micelas catiónicas, catiónicas-no iónicas y anfóteras y los constituidos por vesículas de ácido alquilcarboxílico-alquilcarboxilato de tetrabutilamonio pueden solubilizar compuestos aromáticos mediante interacciones específicas del tipo π -catión. La energía de este tipo de interacciones es del mismo orden de magnitud que la correspondiente a la formación de enlaces por puentes de hidrógeno [28].

Para disolventes supramoleculares de la misma naturaleza, la estructura molecular del tensioactivo también influye en su capacidad de solubilización. Así, la solubilidad de compuestos polares como el fenol en disolventes de micelas no iónicas aumenta a medida que aumenta el número de unidades oxietileno del tensioactivo, debido a un incremento de la fuerza de las interacciones dipolo-dipolo entre los grupos hidrófilos del tensioactivo y del analito. La longitud de la cadena hidrocarbonada del grupo hidrófobo no afecta, sin embargo, a la solubilidad de analitos polares en estos disolventes. [6]. La influencia de la estructura del tensioactivo en la capacidad de solubilización del disolvente supramolecular también se ha estudiado para disolventes de micelas inversas [26] y vesículas [27]. En ambos casos se observa una disminución de la solubilidad del compuesto polar 4-clorofenol a medida que aumenta la longitud de la cadena hidrocarbonada del tensioactivo, probablemente debido a que se produce una disminución de la permeabilidad de los agregados, lo que dificulta la interacción del analito con los centros de solubilización de dichos agregados.

El número de centros de solubilización en el disolvente supramolecular aumenta a medida que lo hace la concentración de tensioactivo en el disolvente. Esta concentración depende de varios factores como la naturaleza del disolvente supramolecular, la estructura molecular y concentración de tensioactivo usada para su producción, la temperatura y la concentración de ácidos y sales. La concentración de tensioactivo en los disolventes de micelas no iónicas aumenta a medida que lo hace la concentración de tensioactivo usada para su obtención. Así, por ejemplo, el contenido en agua del disolvente de micelas de Triton X-100 producido a 35 °C disminuye desde

aproximadamente el 80% al 70% cuando la concentración de tensioactivo aumenta desde 1 a 3% [29]. Por el contrario, la composición de disolventes de micelas aniónicas [16], micelas inversas[26] y vesículas [27] no depende de la concentración de tensioactivo usada para producirlos.

La concentración de tensioactivo en los disolventes supramoleculares de micelas no iónicas también depende de la estructura molecular del tensioactivo y de la temperatura. La concentración disminuye a medida que aumenta la longitud de la cadena hidrocarbonada y el número de unidades oxietileno en el grupo polar del tensioactivo [6] y aumenta a medida que aumenta la diferencia entre la temperatura de operación y la temperatura crítica para la separación de fases [30]. Por lo tanto, aquellos factores que afecten al CP del tensioactivo, como es el caso de la concentración de sales, también influirán en la composición del disolvente supramolecular.

En el caso de disolventes supramoleculares de micelas aniónicas, un aumento en la concentración de ácido da lugar a disolventes más concentrados [16], efecto que también es observado para disolventes de micelas catiónicas cuando se aumenta la concentración de cotensioactivo [31]. Finalmente, el porcentaje de disolvente orgánico usado para la obtención de disolventes de micelas inversas de ácidos alquilcarboxílicos es la variable que más afecta a la composición de estos disolventes supramoleculares; la cantidad de disolvente orgánico que se incorpora al disolvente supramolecular aumenta y por lo tanto, la concentración de tensioactivo disminuye, a medida que aumenta el porcentaje de disolvente orgánico.

Generalmente, un aumento de la concentración de tensioactivo en el disolvente supramolecular va acompañado de una disminución del volumen de disolvente formado, y por lo tanto, de un aumento del factor de preconcentración teórico obtenido. En la Tabla 2 se muestran los factores de preconcentración teóricos obtenidos para disolventes supramoleculares de diferente naturaleza producidos en diferentes condiciones experimentales. Lógicamente, el volumen de disolvente supramolecular obtenido aumenta al aumentar la concentración de tensioactivo usada para su producción, disminuyendo el factor de preconcentración teórico. El factor de preconcentración real varía en función de la recuperación obtenida para cada analito concreto.

Finalmente, las condiciones experimentales usadas para la producción del disolvente supramolecular condicionan el tipo de analitos que es posible extraer en el

mismo. Los disolventes de micelas no iónicas no son adecuados para la extracción de compuestos termolábiles, ya que a las temperaturas a las que se opera, incluso para los tensioactivos con los valores de CP más bajos, estos compuestos se degradan. Los analitos que sufren hidrólisis ácida no pueden extraerse en disolventes de micelas aniónicas, debido a las elevadas concentraciones de ácido que son necesarias para su formación. Estos disolventes tampoco son adecuados para la extracción de compuestos básicos, ya que la solubilidad de estos analitos en disoluciones acuosas ácidas es muy elevada al encontrarse en su forma iónica.

2.3.2. Compatibilidad con técnicas de separación y de detección

Los disolventes supramoleculares son compatibles con las fases móviles utilizadas en cromatografía líquida. Sin embargo, no es posible su inyección directa en cromatografía de gases debido a su baja volatilidad, siendo necesaria la reextracción de los analitos en un disolvente apolar antes de su introducción en el cromatógrafo [34, 35]. Recientemente se ha propuesto la derivatización del tensioactivo como una nueva estrategia que permite introducir extractos de disolventes supramoleculares en el cromatógrafo de gases sin necesidad de realizar una etapa de reextracción [36]. La extracción con disolventes supramoleculares también se ha utilizado como etapa previa a la separación de analitos de diferente naturaleza mediante electroforesis capilar [30]. La introducción de disolventes supramoleculares en el capilar de sílice puede originar problemas de irreproducibilidad y disminución de la resolución electroforética debido a la adsorción del tensioactivo en las paredes del capilar. La adsorción del tensioactivo que constituye el disolvente supramolecular se puede evitar adicionando un tensioactivo catiónico a la disolución de electrolito o utilizando un medio de separación no acuoso (ej. mezclas de acetonitrilo-metanol).

La compatibilidad del disolvente supramolecular con el sistema de detección usado es también un factor clave para la aplicación de estos disolventes en extracciones analíticas. Los disolventes de micelas no iónicas más utilizados, es decir los constituidos por tensioactivos de los grupos Triton X (polioxietileno (n) tert-octilfenil eter) y PONPE (polioxietileno (n) nonilfenil eter), originan importantes interferencias en la detección de analitos polares en cromatografía líquida cuando se utilizan detectores fotométricos en la zona ultravioleta o fluorimétricos midiendo a longitudes de onda de excitación superiores a 300 nm, debido a la existencia de anillos aromáticos en su estructura molecular y a los elevados tiempos de retención que presentan dado su carácter apolar [15]

Tabla 2. Factores de preconcentración teóricos obtenidos para disolventes supramoleculares de diferente naturaleza producidos en diferentes condiciones experimentales

Tipo de disolvente supramolecular	Tensioactivo	Condiciones experimentales	Concentración de tensioactivo (% p/v)	Factor de preconcentración teórico	Ref.
Micelas no iónicas	<i>Alcohol etoxilados</i>				
	C ₁₂ E ₅	0,8 M NaCl, 80° C	2,9 (70 mM)	31	[6]
	C ₁₂ E ₆		3,2 (70 mM)	20	
	C ₁₂ E ₈		3,9 (70 mM)	12	
	C ₁₀ E ₆		3,0 (70 mM)	24	
	C ₁₆ E ₆		3,6 (70 mM)	5	
	Tergitol 15-S-7	0,6 M Na ₂ SO ₄	1,0	40	[32]
	<i>Alquilfenol etoxilados</i>				
	Triton X-114	35° C	0,05	60	[29]
			0,02	20	
		65° C	0,5	500	[33]
			1,0	250	
	<i>Tensioactivos de silicona</i>				
	PEG/PPG-18/18 dimeticona	50° C	0,05	100	[29]
			0,2	50	

Tabla 2. Continuación

Tipo de disolvente supramolecular	Tensioactivo	Condiciones experimentales	Concentración de tensioactivo (% p/v)	Factor de preconcentración teórico	Ref.
Micelas anfóteras	3-[decil-dimetilamonio] propil sulfato	35 °C	2,0	35	[12]
Micelas aniónicas	Dodecilsulfato sódico	4,0 M HCl	0,25	30	[15]
		5,0 M HCl	1,0	11	
		5,0 M HCl	0,25	14	
			1,0	8	
	Dodecilsulfonato sódico	3,0 M HCl	0,25	5	
		4,0 M HCl	1,0	4	
			0,25	117	
			1,0	23	
Micelas catiónicas	Cetrimida	6,8 M NaCl, 0,05 (% v/v) 1-octanol	0,5	5	[14]
		6,8 M NaCl, 0,08 (% v/v) 1-octanol	0,5	35	

Tabla 2. Continuación

Tipo de disolvente supramolecular	Tensioactivo	Condiciones experimentales	Concentración de tensioactivo (%, p/v)	Factor de preconcentración teórico	Ref.
Micelas inversas de ácidos alquilcarboxílicos	Ácido decanoico	5 (% v/v) THF	0,2	362	[26]
			1,0	72	
	Ácido octanoico	15 (% v/v) THF	0,2	200	
			1,0	40	
Vesículas de ácidos alquilcarboxílicos	Ácido octanoico	[Bu ₄ NOH]/ [Tensioactivo] = 0,5	0,1	400	[27]
			1,0	50	
	Ácido decanoico		0,1	400	
			1,0	69	
	Ácido dodecanoico		0,1	277	
			1,0	51	
Ácido tetradecanoico		0,1	208		
		1,0	73		

2.3.3. Otras propiedades de los disolventes supramoleculares

Propiedades como la densidad y viscosidad del disolvente supramolecular influyen en los modos de operación utilizados en el laboratorio. Cuando el disolvente supramolecular es más denso que la disolución en equilibrio, dicha disolución debe ser retirada antes de tomar el volumen de extracto que contiene a los analitos y que será introducido en el sistema cromatográfico. Generalmente esta operación se realiza enfriando los tubos, con lo que se consigue aumentar la viscosidad del extracto supramolecular, y decantando la disolución sobrenadante. Las trazas de disolución se eliminan mediante evaporación usando una corriente de nitrógeno. La mayoría de los disolventes supramoleculares de micelas no iónicas [29, 37-39] y los de micelas anfóteras [12] son más densos que sus disoluciones en equilibrio, y por el contrario, los disolventes de micelas iónicas [14, 15], micelas inversas [26] y vesículas [27] son menos densos que dichas disoluciones, lo que simplifica el proceso de introducción del extracto en el cromatógrafo.

Los disolventes de micelas no iónicas y anfóteras presentan además una elevada viscosidad, lo que obliga a diluir los extractos obtenidos con disolventes orgánicos antes de su introducción en el cromatógrafo de líquidos. La viscosidad de estos disolventes aumenta a medida que aumenta la temperatura y la concentración de sales. Los extractos de disolventes de micelas iónicas, micelas inversas y vesículas se pueden inyectar directamente en el sistema cromatográfico sin necesidad de realizar una dilución previa de los mismos.

Finalmente, en general, los disolventes supramoleculares son poco tóxicos y biodegradables, con la excepción de los constituidos por tensioactivos que contienen anillos aromáticos (ej. tensioactivos no iónicos de los grupos Triton X-100 y PONPE). Estos compuestos son muy persistentes en el medio ambiente y sus metabolitos (ej. derivados fenólicos) presentan una elevada toxicidad [40].

2.4. Aplicaciones de los disolventes supramoleculares en extracciones analíticas

En la Tabla 3 se resumen las principales aplicaciones de disolventes supramoleculares constituidos por diferentes tipos de agregados en extracciones analíticas. Los disolventes más ampliamente utilizados han sido los constituidos por micelas de tensioactivos no iónicos, siendo su principal área de aplicación la extracción

de compuestos orgánicos hidrófobos en muestras acuosas medioambientales previa a su determinación cromatográfica [30, 41, 42]. La determinación de metales basada en la formación de un complejo hidrófobo, extracción del mismo en el disolvente supramolecular y cuantificación de los analitos mediante técnicas atómicas también ha encontrado numerosas aplicaciones [41, 46]. En este último caso, se ha propuesto tanto el uso de disolventes de micelas simples de tensioactivos no iónicos como de disolventes de micelas mixtas de tensioactivos no iónicos y no iónicos-iónicos.

El análisis ambiental también ha sido la principal área de aplicación de los disolventes de micelas iónicas y de micelas inversas y vesículas de ácidos alquilcarboxílicos. Estos disolventes proporcionan diferentes tipos de interacciones con los analitos orgánicos permitiendo la extracción de compuestos en un amplio intervalo de polaridades. El principal inconveniente de los disolventes de micelas iónicas estriba en la elevada concentración de sales o ácidos que generalmente es necesaria para que se produzca la separación de fases, lo que ha restringido su uso. No obstante, se han propuesto algunas aplicaciones muy interesantes para muestras sólidas en las que la elevada concentración de ácido usada para la formación de disolventes de micelas aniónicas contribuye favorablemente al proceso de extracción [21, 22]. Los disolventes de micelas inversas y vesículas de ácidos alquilcarboxílicos no presentan estos inconvenientes y además, se caracterizan por poseer una elevada concentración de tensioactivo, lo que permite obtener elevados rendimientos de extracción usando pequeños volúmenes de disolvente.

Los métodos de extracción basados en el uso de disolventes supramoleculares no iónicos propuestos en el ámbito del análisis de alimentos han sido muy escasos y fundamentalmente enfocados a la determinación de metales. Esto ha sido probablemente debido a la baja capacidad de este tipo de disolventes para extraer compuestos polares de interés para el control de la calidad de los alimentos (plaguicidas, drogas de uso veterinario, contaminantes orgánicos hidrosolubles, etc.). Aunque escasos, son prometedores los resultados obtenidos con el uso de disolventes de micelas inversas y vesículas de ácidos alquilcarboxílicos para la extracción de compuestos polares en alimentos. Así, por ejemplo, se han propuesto métodos para la extracción de bisfenol A en productos enlatados y bebidas [66, 67] y de fungicidas del grupo de los benzimidazoles en frutas y verduras [68] basados en el uso de disolventes de micelas inversas y vesículas, respectivamente.

Finalmente, los disolventes de micelas anfóteras no han encontrado aplicaciones para la extracción de analitos en muestras reales. Sólo se han usado para la extracción y purificación de proteínas hidrófobas a baja temperatura, lo que evita su desnaturalización [12].

Tabla 3. Aplicaciones de disolventes supramoleculares constituidos por diferentes tipos de agregados en extracciones analíticas

Tipo de disolvente supramolecular	Análitos	Muestras	Referencias
Micelas no iónicas	Contaminantes orgánicos	Aguas naturales y residuales, suelos, cenizas y materiales biológicos	[30, 41-44]
	Plaguicidas	Cereales y frutas	[49-51]
	Ácidos húmicos y fúlvicos	Aguas naturales	[45]
	Drogas terapéuticas	Plasma y saliva	[47]
	Vitaminas	Sangre y suero	[48]
	Metales	Aguas naturales y residuales, suelos, sedimentos y materiales biológicos	[41, 46]
Micelas catiónicas	Clorofenoles	Leche, zumo de frutas y mariscos	[52-54]
	Toxinas	Aguas naturales	[14]
		Aguas naturales	[13]

Tabla 3. Continuación

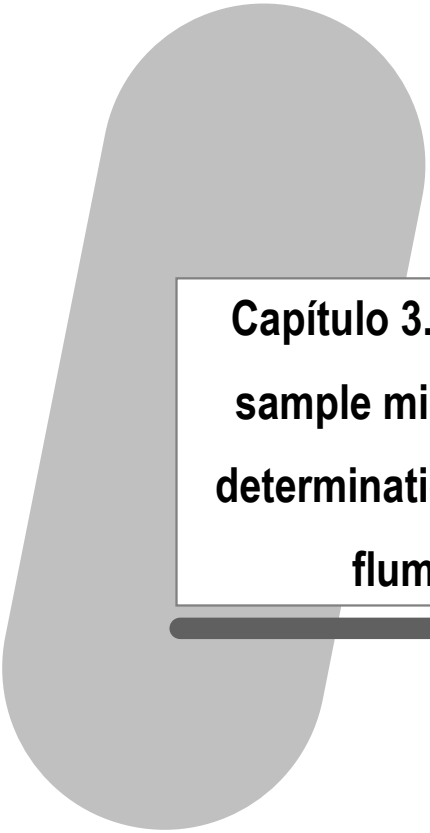
Tipo de disolvente supramolecular	Análitos	Muestras	Referencias
Micelas aniónicas	Contaminantes orgánicos	Aguas naturales, suelos, sedimentos y lodos residuales	[17-23]
	Plaguicidas	Verduras	[17]
Micelas mixtas no iónicas	Contaminantes orgánicos	Aguas naturales y suelos	[55, 56]
	Metales	Aguas naturales y vinos	[57, 58]
Micelas mixtas catiónicas- no iónicas	Ácidos húmicos y fúlvicos	Aguas naturales	[59]
	Metales	Suelos y aguas naturales y residuales	[60, 61]
		Zumo de frutas	[61]
Micelas mixtas aniónicas- no iónicas	Plaguicidas	Aguas naturales y material biológico	[62]
	Metales	Aguas naturales	[63]
Micelas inversas	Contaminantes orgánicos	Aguas naturales y residuales	[26, 64]
	Bisfenol A	Orina	[65]
	Ocratoxina A	Alimentos enlatados y bebidas	[66, 67]
		Vino	[67]
Vesículas	Contaminantes orgánicos	Aguas naturales y residuales	[26, 27]
	Plaguicidas	Frutas y verduras	[68]

3. BIBLIOGRAFÍA

- [1] B. Gander, M.J. Blanco-Prieto, C. Thomasin, Ch. Wandrey, D. Hunkeler, Coacervation/Phase Separation. In Encyclopedia of Pharmaceutical Technology; J. Swarbrick, J.C. Boylan(Eds.) Marcel Dekker (2002) New York, USA.
- [2] B. Mohanty, Bohidar, H.B. *Biomacromolecules* 4 (2003) 1080.
- [3] IUPAC Compendium of chemical terminology 31 (1972) 611.
- [4] Y. Wang, K. Kimura, Q. Huang, P.L. Dubin, W. Jaeger, *Macromolecules* 32 (1999) 7128.
- [5] H. Ishii, J. Miura, H. Watanabe, *Bunseki Kagaku* 26 (1997) 252.
- [6] P. Taechangam, J.F. Scamehorn, S. Osuwan, T. Rirksomboon, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 347 (2009) 200.
- [7] H. Scohott, *J. Colloid Sci.* 260 (2003) 219.
- [8] K. Materna, J. Szymanowski, *J. Colloid Interface Sci.* 255 (2002) 195.
- [9] Y. Ren, H. Liu, X. Yao, M. Liu, Z. Hu, B. Fan, *J. Colloid Interface Sci.* 302 (2006) 669.
- [10] H. Akbaş, C. Batigöç, *Fluid Phase Equilibr.* 279 (2009) 115.
- [11] M. J. Rosen, *Surfactants and Interfacial Phenomena*, 3rd edition, John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, 2004, p. 197.
- [12] T. Saitoh, W.L. Hinze, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2520
- [13] B. K. W. Man, M. H. W. Lam, P. K. S. Lam, R. S. S. Wu, G. Shaw, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 3985.
- [14] X. Jin, M. Zhu, E. D. Conte, *Anal. Chem.* 71 (1999) 514.
- [15] I. Casero, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito *J. Chromatogr. A* 71 (1999) 4519.
- [16] D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 460 (2002) 13.
- [17] A. Santalad, S. Srijaranai, R. Burakham, T. Sakai, R.L. Deming, *Microchem. J.* 90 (2008) 50.
- [18] G. Jia, L. Li, J. Qiu, X. Wang, W. Zhu, Y. Sun, Z. Zhou, *Spectrochim. Acta A* 67 (2007) 460.
- [19] I. Y. Goryacheva, S.N. Shtykov, A. S. Loginov, I.V. Panteleeva, *Anal. Bional. Chem.* 382 (2005) 1413.
- [20] D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, N. Maniasso, E.A.G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta* 392 (1999) 29.
- [21] F. J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 109.
- [22] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito *J. Chromatogr. A* 962 (2002) 1.

- [23] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 998 (2003) 143.
- [24] T. Inoue, H. Ohmura, *J. Colloid Interf. Sci.* 258 (2003) 374.
- [25] T. Gu, P. A. Galera-Gómez, *Colloids Surf. A* 104 (1995) 307.
- [26] F. J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7473.
- [27] F. J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 78 (2006) 7229.
- [28] E. V. Anslyn, D. A. Dougherty (2004). *Modern Physical Organic Chemistry*. University Science Books, Sausalito, 2006, Chapter 3.
- [29] B. Yao, L. Yang, *J. Colloid Interface Sci.* 319 (2008) 316.
- [30] R. Carabias-Martinez, E. Rodriguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J. L. Pérez-Pavón, C. García-Pinto, E. Fernández Laespada, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 251.
- [31] E. W. Crick, E. D. Conte, *J. Chromatogr. A* 877 (2000) 87.
- [32] J. L. Li, B. H. Chen, *J. Colloid Interface Sci.* 263 (2003) 625.
- [33] M. A. Farajzadeh, M. R. Fallahi, *Anal. Sci.* 22 (2006) 635.
- [34] A. R. Fontana, M. F. Silva, L. D. Martínez, R. G. Wuilloud, J. C. Altamirano, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4339.
- [35] P. D. Zygoura, E. K. Paleologos, K. A. Riganakos, M. G. Kontominas, *J. Chromatogr. A* 1093 (2005) 29.
- [36] Y. Takagi, W. L. Hinze, *Anal. Chem.* 81 (2009) 7113.
- [37] A. Niazi, T. Momeni-Isfahani, Z. Ahmari, *J. Hazard. Mater.* 165 (2009) 1200.
- [38] N. Pourreza, S. Rastegarzadeh, A. Larki, *Talanta* 77 (2008) 733.
- [39] J. L. Manzoori, H. Abdolmohammad-Zadeh, M. Amjadi *J. Hazard. Mater* 144 (2007) 458.
- [40] K. Materna, I. Milosz, I. Miesiac, G. Cote, J. Szymanowski, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 2341
- [41] E.K. Paleologos, D. L. Giokas, M.I. Karayannis, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 426.
- [42] J.J. Santana, Z. Sosa, D. Vega, M.E. Torres, C. Mahugo, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 725.
- [43] J. Zhou, J. Chen, Y. Cheng, D. Li, F. Hu, H. Li, *Talanta* 79 (2009) 189.
- [44] C. García-Pinto, J.L. Pérez-Pavón, B. Moreno-Cordero, *Anal. Chem.* 66 (1994) 874.
- [45] R.L. Revia, G.A. Makharadze, *Talanta* 48 (1999) 409.
- [46] C. Bosh, F. Sánchez, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 759.
- [47] M.D. Rukhadze, S.K. Tsagareli, N.S. Sidamonidze, V.R. Meyer, *Anal. Biochem.* 287 (2000) 279.

-
- [48] S.R. Sirimanne, D.G. Patterson, L. Ma, J.B. Justice, *J. Chromatogr. B* 716 (1998) 129.
- [49] Z. Zhou, J. Chen, D. Zhao, M. Yang, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 8722.
- [50] J. Chen, W. Zhao, W. Liu, Z. Zhou, M. Yang, *Food Chem.* 115 (2009) 1038.
- [51] A. Santalad, S. Srijaranai, R. Burakham, J.D. Glennon, R.L. Deming, *Anal. Bional. Chem.* 394 (2009) 1307.
- [52] A.R. Rod, S. Borhani, F. Shemirani, *Eur. Food Res. Technol.* 223 (2006) 649.
- [53] M.B. Gholivand, A. Babakhanian, E. Rafiee, *Talanta* 76 (2008) 503.
- [54] Y. Li, B. Hu, *Spectrochim. Acta B* 62 (2007) 1153.
- [55] B. Delgado, V. Pino, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso, *Anal. Chim. Acta* 518 (2004) 165.
- [56] E. Evdokimov, R. von Wandruszka, *Anal. Lett.* 31 (1998) 2289.
- [57] D. L. Giokas, E.K. Paleologos, M.I. Karayannis, *Anal. Bional. Chem.* 373 (2002) 237.
- [58] E.K. Paleologos, D.L. Giokas, S.M. Tzouwara-Karayanni, M. I. Karayannis, *Anal. Chim. Acta* 458 (2002) 241.
- [59] J.C.A. de Wuilloud, R.G. Wuilloud, B.B.M. Sadi, J.A. Caruso, *Analyst*, 128 (2003) 453.
- [60] N.N. Meeravali, S.J. Jiang, *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 1365.
- [61] M.B. Gholivand, A. Babakhanian, E. Rafiee, *Talanta* 76 (2008) 503.
- [62] A. R. Zarei, *Anal. Biochem.* 369 (2007) 161.
- [63] H. Filik, F. Dondurmacioglu, R. Apak, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 88 (2008) 637.
- [64] A. Balleteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1203 (2008) 168.
- [65] A. Garcia Prieto, M.L. Lunar, S. Rubio, M.D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta*, 630 (2008) 19.
- [66] A. García-Prieto, L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 617 (2008) 51.
- [67] A. Balleteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 530.
- [68] A. Moral, M.D. Sicilia, S. Rubio, *Anal. Chim. Acta* 650 (2009) 207.



**Capítulo 3. Supramolecular solvents in solid
sample microextractions: Application to the
determination of residues of oxolinic acid and
flumequine in fish and shellfish**



Supramolecular solvents in solid sample microextractions: Application to the determination of residues of oxolinic acid and flumequine in fish and shellfish

Esther María Costi, María Dolores Sicilia, Soledad Rubio*

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Córdoba, Edificio Anexo Marie Curie,
Campus de Rabanales, 14071 Córdoba, Spain

Abstract

Supramolecular solvents are here proposed firstly as extractants in solid sample microextractions. The approach was evaluated by extracting flumequine (FLU) and oxolinic acid (OXO), two widely used veterinary medicines, from fish and shellfish muscle using a supramolecular solvent made up of decanoic acid (DeA) reverse micelles. The antibiotics were extracted in a single step (~15 min), at room temperature, using 400 μL of solvent. After centrifugation, an aliquot of the extract was directly analyzed by liquid chromatography and fluorescence, without the need of clean-up or solvent evaporation. Contrary to the previously reported methods, both OXO and FLU were quantitatively extracted from fish and shellfish, independently of sample composition. The high extraction efficiencies observed for these antibiotics were a consequence of their amphiphilic character which resulted in the formation of DeA-OXO and DeA-FLU mixed aggregates. The quality parameters of this quantitative method including sensitivity, linearity, selectivity, repeatability, trueness, ruggedness, stability, decision limit and detection capability were evaluated according to the 2002/657/EC Commission

Decision. Quantitation limits in the different samples analyzed (salmon, sea trout, sea bass, gilt-head bream, megrim and prawns) ranged between 6.5 and 22 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for OXO and, 5 and 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for FLU. These limits were far below the current maximum residue limits (MRLs) set by the European Union (EU) (i.e. 100 and 600 $\mu\text{g kg}^{-1}$, for OXO and FLU, respectively). The trueness of the method was determined by analyzing a Certified Reference Material (CMR, BCR[®] -725) consisting of a lyophilised salmon tissue material. Recoveries for fortified samples (50–100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of OXO and 50–600 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of FLU) and their relative standard deviations were in the intervals 99–102% and 0.2–5%, respectively. The repeatability, expressed as relative standard deviation, was 3.6% for OXO and 2.3% for FLU ([OXO] = [FLU] = 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and n = 11).

Keywords: microextraction, supramolecular solvent, quinolone antibiotics, fish, shellfish, liquid chromatography/fluorescence detection.

1. Introduction

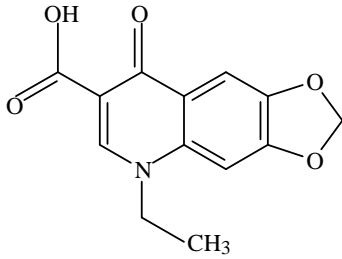
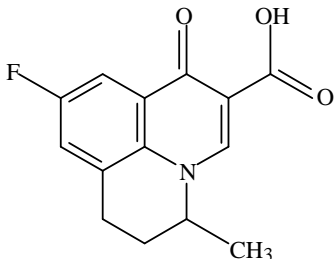
Legislation intended to meet the worldwide demand for safe food supplies has become increasingly restrictive. As a result, food control laboratories have to deal with a huge number of samples for which they must ensure unequivocal identification and exact quantitation of the prohibited/legislated substances. In this context, analysis of residues/contaminants in solid food samples (e.g. edible tissues from animals) is a challenge for lab scientists, specially the sample treatment step, for which breakthrough methodologies are lacking [1–3].

Most of the sample preparation approaches routinely used in solid food analysis involve repetitive extractions with organic solvents, filtration or centrifugation, interference removal by liquid–liquid (LLE) and/or solid-phase (SPE) extraction and solvent evaporation [4–9]. These procedures often take up most of the total analysis time, contribute highly to the analysis error and cost and are the main sources of waste.

Different techniques have been accepted to some extent by labs in order to increase extraction efficiency (e.g. microwave-assisted extraction, MAE, and pressurized liquid extraction, PLE [10]) and reduce solvent consumption (e.g. supercritical fluid extraction, SFE [11]) or complexity (e.g. matrix solid-phase dispersion, MSPD [12]). However, there is a gap in the development of microextraction techniques for the treatment of solid food samples, mainly because of the low extraction efficiency of organic solvents in such complex matrices (e.g. edible tissues from animals contain collagen, muscle proteins, elastin, fat, other lipids and mineral constituents).

In this work, the capability of supramolecular solvents for the microextraction of residues from solid food samples is firstly investigated. Supramolecular solvents are water-immiscible liquids made up of large surfactant aggregates dispersed in a continuous phase (usually water) [13]. They spontaneously form in micellar or vesicular aqueous or hydro-organic solutions by the action of an external stimulus (e.g. temperature, electrolyte, pH, solvent), which induces the formation of larger aggregates, often keeping the morphology, and causes their separation from the bulk solution by a phenomenon named coacervation [14].

Table 1. Chemical structures, ionization constants (pK_a), octanol-water partition coefficients (logK_{ow}) and numbers of donor and acceptor groups for oxolinic acid and flumequine

Quinolone antibiotic	Chemical structure	^a pK _a	^b Log K _{ow}	^c Hydrogen donor and acceptor sum
Oxolinic acid (OXO)		6.78	0.94	7
Flumequine (FLU)		6.65	1.6	5

^aObtained from Ref. [28]^bObtained from the ChemIDplus Lite database, National Institutes of Health (USA). Available from: <http://toxnet.nlm.nih.gov>^cCalculated using the Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V8.14 for Solaris

Supramolecular solvents have two outstanding properties that should make them suitable for microextractions. The first one derives from the special structure of the ordered aggregates that constitute them. Thus, they have regions of different polarities that provide a variety of interactions for analytes. The type of interaction may be tuned varying the hydrophobic or the polar group of the surfactant and in theory one may design the most appropriate extractant for a specific application because amphiphiles are ubiquitous in nature and synthetic chemistry. A second major feature of supramolecular solvents is the high concentration of amphiphiles, and therefore of binding sites, they contain (typically 0.1-1 mg μL^{-1}). This characteristic permits to achieve high extraction efficiencies using low extractant volumes, which is requisite in microextractions. Additional interesting properties for extractions include non-volatility and non-flammability, which permits the implementation of safer processes, and the use of self-assembly based synthetic procedures that are within everyone is reach.

Application of non-ionic micelle-based supramolecular solvents to the analytical extraction of contaminants from environmental waters has been known for a long time and the corresponding extraction approach has been named cloud point technique in the analytical literature [15–17]. In the last decade, developments in this area have focused on the use of supramolecular solvents made up of zwitterionic [18], cationic [19] or anionic [20] micelles, which have avoided the problems of coelution caused by non-ionic surfactants in LC and have made the extract compatible with MS. Recently, supramolecular solvents consisting of vesicles [21] and reverse micelles [22] of biosurfactants, such as alkylcarboxylic acids, have been reported and have marked a turning point with regard to the type of aggregates that constitute them, the variety of interactions they can establish with analytes and the high concentration of amphiphiles they contain.

Despite the high potential of supramolecular solvents for the extraction of contaminants in solid samples, only a few applications involving sludge [23,24], soils [24], ashes [25] and foods [26,27] have been reported. Extractions in these matrices invariably involve sample amounts below 1 g and aqueous solutions (10-40 mL) containing the dispersed supramolecular solvent (typically 100-500 μL), which is separated from the bulk solution after extraction by centrifugation. This approach is not convenient for the extraction of highly polar analytes, which may distribute between the water and surfactant-rich phase, and makes extraction miniaturization difficult. To our knowledge, no applications involving the direct addition of the supramolecular solvent to the solid sample have been developed.

In this work, the potential of supramolecular solvents to be used in solid food microextractions was investigated using oxolinic acid (OXO) and flumequine (FLU) (Table 1) as model analytes. These compounds are two highly polar acidic quinolone antibiotics (AQAs) extensively used as antimicrobial agents in aquaculture. The food matrices selected were the muscles from a variety of fishes and shellfishes. Maximum residue limits (MRLs) set by the EU for OXO and FLU in seafood are 100 and 600 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, respectively [29]. Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment have been critically reviewed [30,31]. Methods for the determination of quinolone residues in seafood are based on liquid chromatography with fluorescence [32–34] or mass spectrometric detection using matrix-matched calibration [34–36]. Reported sample treatment procedures consume considerable volumes of toxic organic solvents (typically 7-24 mL per sample [32,34–36]) and include repetitive extractions,

solvent evaporation and clean-up steps, which makes them slow and tedious. The supramolecular solvent made up of decanoic acid reverse micelles [22] was used as extractant on the basis of its capacity to bind analytes through hydrophobic and hydrogen bonding interactions and the high concentration of aggregates ($0.76 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$) making it up. Microextractions were carried out in 2 mL microtubes involving minute sample amounts and supramolecular solvent volumes.

The influence of experimental variables on the efficiency of the extraction of the target analytes was investigated, the quality parameters of the method including sensibility, linearity, selectivity, repeatability, trueness, ruggedness, stability, decision limit (CC α) and detection capability (CC β) were evaluated according to the 2002/657/EC Commission Decision [37], and OXO and FLU were quantified in the muscle of aquaculture seafood. Below, the main results obtained are presented and discussed.

2. Experimental

2.1. Reagents and standards

All chemicals were of analytical reagent-grade and were used as supplied. Oxalic acid and LC-grade acetonitrile, methanol and tetrahydrofuran (THF) were supplied by Panreac (Barcelona, Spain) and decanoic acid (DeA) by Fluka (Buchs, Switzerland). Ultrahigh-quality water was obtained from a Mili-Q water purification system (Millipore, Madrid, Spain). High-purity (>98%) oxolinic acid (OXO) and flumequine (FLU) standards were obtained from Sigma (Saint Louis, MI, USA). Stock solutions, 100 mg L^{-1} of each antibiotic, were prepared in acetonitrile and stored at 4°C . A 2 mL-working solution containing 1.5 mg L^{-1} of OXO and FLU was daily prepared from the stock solution by dilution with the supramolecular solvent. Seven calibration solutions, containing amounts of OXO and FLU in the ranges 2.5–500 and 1.5–500 ng, respectively, were prepared in 0.5 mL-volumetric flasks from the working solution by dilution with the supramolecular solvent. The Certified Reference Material (CRM) used for method validation (BCR[®] -725) consisted of lyophilised salmon tissue (skin included) and was supplied by LGC Standards GmbH (Wesel, Germany). It was stored under dark at -70°C . The certified contents of OXO and FLU were $600 \pm 100 \mu\text{g Kg}^{-1}$ and $1170 \pm 210 \mu\text{g Kg}^{-1}$, respectively.

2.2. Apparatus

The liquid chromatographic system used consisted of a ThermoQuest Spectra System (San Jose, CA, USA) furnished with a P4000 quaternary pump, a SCM 1000 vacuum membrane degasser, an AS3000 auto-sampler and a FL3000 fluorescence detector. The stationary-phase column was a Kromasil C₁₈ column (5 μm, 150 mm × 4.6 mm) from Analisis Vinicos (Tomelloso, Spain). A homogenizer-disperser Ultra-Turrax T25 Basic from Ika (Werke, Germany), a vortex-shaker REAX Top equipped with an attachment (ref. 549-01000-00) for 10 microtubes from Heidolph (Schwabach, Germany) and a high speed brushless centrifuge MPW-350R equipped with an angle rotor 36 × 2.2/1.5 mL (ref. 11462) from MPW Med-Instruments (Warszawa, Poland) were used for sample preparation. A magnetic stirrer Basicmagnix from Ovan (Barcelona, Spain) and a digitally regulated centrifuge Mixtasel equipped with an angle rotor 4 mL × 100 mL (ref. 7001326) from JP-Selecta (Abrera, Spain) were used for supramolecular solvent production.

2.3. Supramolecular solvent production

The following procedure, which permits to obtain a supramolecular solvent volume (~8.5 mL) able to treat 20 fish samples, was routinely followed. Decanoic acid (6.5 g) was dissolved in THF (4.2 mL) in a 100 mL-glass centrifuge tube. Then, 80 mL of a 10 mM hydrochloric acid aqueous solution was added. The mixture was magnetically stirred for 5 min, time in which the supramolecular solvent spontaneously formed into the bulk solution. Then, the suspension was centrifuged at 3500 rpm for 10 min to speed solvent separation up, which is less dense than water. Next, it was withdrawn using a 10 mL syringe, transferred to a hermetically close storage glass vial to avoid THF losses and stored at 4° C. Under these conditions, the solvent produced was stable for at least one month. The volume of solvent obtained can be adjusted at will by choosing an appropriate, constant DeA/THF/water proportion.

2.4. Determination of OXO and FLU in aquaculture products

2.4.1. Sample preparation

Aquaculture fishes (salmon, sea trout, sea bass, megrim and gilt-head bream) and shellfishes (prawns) were bought in supermarkets in Córdoba (Spain). Their head, fishbone and backbones were removed and the muscle, including the skin, filleted. Head-less prawns were peeled and the tail removed. Cleaned fishes and prawns were stored at -20°C until analysis. After thawing, about 200 g of sample was chopped and homogenized using a homogenizer-disperser. Then, portions of about 200 mg were taken for analysis and recovery experiments, which were performed in triplicate. Spiking of chopped samples (200 mg) was done by adding volumes in the range 2.5–200 μL of a solution containing OXO and FLU (2 mg L^{-1} each) in acetonitrile. Spiked samples were allowed to stand at room temperature for 15 h before analysis. Both analytes were stable in the samples during the holding time.

2.4.2. Microextraction of OXO and FLU

About 200 mg of chopped sample and 400 μL of supramolecular solvent were mixed in a 2 mL-microtube Safe-Lock from Eppendorf Ibérica (Madrid, Spain). A micro PTFE-coated bar (3 mm \times 10 mm, Pobel, Madrid, Spain) was introduced in the microtube to favour sample dispersion during extraction, which was made by sample vortex-shaken at 2500 rpm for 15 min. Then, the mixture, thermostated at 15°C , was centrifuged at 15000 rpm ($16720 \times g$) for 15 min. The supramolecular extract was withdrawn using a microsyringe, transferred to an auto-sampler vial and injected (20 μL) into the liquid chromatographic system.

2.4.3. Liquid chromatography-fluorescence detection

Separation of OXO and FLU was carried out by liquid chromatography using isocratic elution and their quantitation was performed by fluorescence detection. The mobile phase consisted of 55% oxalic acid (0.01 M) and 45% acetonitrile/methanol (75:25, v/v) at a flow rate of 1 mL min^{-1} [34]. Fluorescence measurements were performed at 325 nm (excitation wavelength) and 360 nm (emission wavelength). Calibrations curves ($n = 7$) were run from standards dissolved in supramolecular solvent by injecting amounts of OXO and FLU in the intervals 0.1–20 ng and 0.06–20 ng, respectively, and quantitation

was performed by measuring peak areas. Daily, cleaning of the column was performed by flushing methanol through it.

3. Results and discussion

3.1. Supramolecular solvent-based microextraction of OXO and FLU

3.1.1. Solvent composition

The reverse micelle-based supramolecular solvent used in this research spontaneously forms in ternary mixtures of DeA, water and THF at well-defined proportions (Fig. 1). Its formation occurs through two sequential self-assembly processes. First, DeA molecules aggregate as reverse micelles in THF and then, under the addition of water, they rearrange in larger reverse micelles that separate from the bulk solution, as an immiscible liquid, through a mechanism that remains elusive. The immiscible liquid is made up of reverse micelles, THF and minute amounts of water. Because of reverse micelles are only formed from protonated DeA molecules ($pK_a = 4.8 \pm 0.2$), the pH of the ternary mixture should be kept below 4 to ensure maximal solvent production.

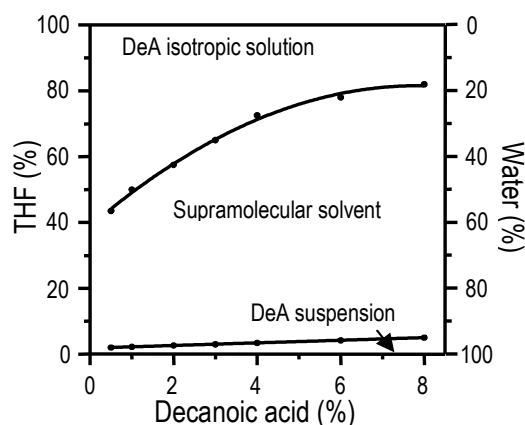


Fig. 1. Diagram of phase boundaries for THF-decanoic acid-water mixtures.

Both solvent volume and composition depend on the absolute amount of DeA and/or the THF/water proportion in the bulk solution. The volume of solvent formed (V_s , in mL) can be estimated from the following equation [38]:

$$V_S = 1.035 A_{DeA} e^{0.04731 [THF]}$$

where A_{DeA} is the amount of DeA in g and [THF] the percentage (v/v) of this solvent in the water:THF solution. The linear relationship between V_S and A_{DeA} indicates that the composition of the supramolecular solvent keeps constant as the percentage of THF in the bulk solution remains unchanged. On the other hand, the exponential relationship between V_S and [THF] reveals that the volume of THF incorporated into the supramolecular solvent increases as the percentage of THF used to produce it does, which results in decreased biosurfactant concentration in the supramolecular solvent. The concentration of DeA in supramolecular solvents produced from solutions containing different THF percentages was found by LC-UV and the results obtained are shown in Table 2. The concentration of biosurfactant in the solvent decreased about 3.6-fold by increasing the concentration of THF in the bulk solution from 5 to 30%.

3.1.2. Solvent binding capability

A good knowledge of the interactions between the solvent and analytes is important for setting up an efficient extraction scheme. Reverse micelles of decanoic acid may solubilise solutes based on both hydrophobic interactions in the hydrocarbons tails and hydrogen bonds in the carboxylic acid polar groups. On the other hand, the planarity of the quinolone ring and the nature of the functional groups present in OXO and FLU molecules (Table 1) suggest the possibility of several types of intra- and intermolecular interactions. The self-association of OXO in aqueous solutions through intramolecular interactions has been proved [39]. Intermolecular interactions between OXO/FLU and the solvent can be of two types; hydrophobic and hydrogen bonding, and according to analyte structure, multiple solvent-analyte intermolecular interactions can occur. These strong solvent:analyte associations should permit the development of robust and efficient microextraction methods.

3.1.3. Factors affecting the extraction efficiency of the solvent

The effect of experimental variables on the efficiency of the extraction of AQAs from aquaculture seafood was investigated by extracting salmon muscle (skin included, ~200 mg) spiked with OXO and FLU at a concentration of 200 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ each.

Experiments were made in triplicate. The protein content of salmon (19.9 g per 100 g of sample) was representative of the content of this ingredient in 100 g of the fishes/shellfishes analyzed (it ranged between 15.8 and 23.8 g), while its fat content (10.8 g) was far above that of the other ones (1.3–3.6 g) [40,41]. Selection of the optimal conditions was based on the recoveries and the method quantitation limits (MQLs) obtained. MQLs were calculated from the instrumental quantitation limits (0.11 ng for OXO and 0.06 ng for FLU), the volume of supramolecular solvent used for extraction, the recoveries obtained and the sample weight used for analysis. The variables investigated were: composition and volume of extractant, pH, sample amount, time required to reach equilibrium conditions and time of centrifugation necessary to obtain free-particle extracts. The representativity of the amount of sample selected for seafood analysis, after applying the sample treatment recommended in Section 2.4.1, was also investigated.

Supramolecular solvents containing different amounts of DeA per unit volume were produced from solutions containing 6.5 g of decanoic acid and variable percentages of THF (5–30%; total water + THF volume = 85 mL) according to the procedure specified in the Section 2.3. In this way, supramolecular solvents containing DeA concentrations between 210 and 763 mg μL^{-1} were obtained (Table 2) and 400 μL aliquots were used for extraction of OXO and FLU from salmon. The recoveries and MQLs obtained from these experiments are shown in Table 2. The extraction capability of the supramolecular solvents decreased as its biosurfactant content did owing to the reduction of micellar solubilisation sites. The solvent produced using a 5% of THF provided quantitative recoveries and the lowest MQLs for both OXO and FLU, so it was selected for further studies. Lower THF percentages could not be used for solvent production because decanoic acid (6.5 g) was insoluble in the resulting water:THF solutions.

The volume of supramolecular solvent used to extract the target antibiotics from salmon influenced both extraction efficiency and reproducibility (Table 3). Both recoveries and precision increased as the volume of the supramolecular solvent did while MQLs progressively degraded. Because of the MRLs set for both OXO and FLU are far above the MQLs found in this study, recoveries and precision were the parameters used for selection. In consequence, a volume of 400 μL aliquots was chosen as optimal.

Table 2. Concentrations of decanoic acid in the supramolecular solvent, mean recoveries and method quantitation limits obtained for oxolinic acid and flumequine as a function of the percentage of THF used to produce the solvent

%THF	[DeA] (mg μL^{-1})	Recovery ^a \pm s ^b (%)		MQL ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	
		OXO	FLU	OXO	FLU
5	0.76	98 \pm 1	99 \pm 1	11.5	6.5
10	0.54	91 \pm 7	94 \pm 3	12.4	6.8
15	0.43	86 \pm 1	88 \pm 1	13.1	7.3
20	0.34	80 \pm 5	83 \pm 1	14.1	7.7
30	0.21	76 \pm 1	78 \pm 1	14.9	8.2

^a200 mg of salmon sample spiked with 200 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ of OXO and FLU; Volume of supramolecular solvent = 400 μL

^bn=3

Table 3. Mean recoveries and method quantitation limits obtained for oxolinic acid and flumequine as a function of the volume of supramolecular solvent used for extraction.

Volume of supramolecular solvent (μL)	Recovery ^a \pm s ^b (%)		MQL ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	
	OXO	FLU	OXO	FLU
100	35 \pm 8	34 \pm 10	8.1	4.7
200	77 \pm 3	74 \pm 1	7.3	4.3
300	89 \pm 5	99 \pm 1	9.5	4.8
400	98 \pm 1	100 \pm 1	11.5	6.4
500	99 \pm 1	99 \pm 2	14.3	8.0

^a200 mg of salmon sample spiked with 200 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ of OXO and FLU

^bn=3

The pH had no influence on OXO and FLU extraction. This parameter was investigated by producing the supramolecular solvent from water solutions in which the pH was adjusted between 1 and 4 with hydrochloric acid. Then, 400 μL aliquots of these solvents was used for extraction. Both recoveries and reproducibility remained constant in the interval investigated.

Time used for extraction and centrifugation of samples influenced the recoveries obtained for AQAs (Table 4). Equilibrium conditions were reached after 15 min of vortex shaking-assisted extraction (vibration motion = 2500 rpm). Recoveries kept about 100% at higher extraction times and decreased at lower ones. The minimum centrifugation time required to reach quantitative recoveries was 15 min. At shorter rotation times, no effective separation of the supramolecular extract from the sample particles was obtained which resulted in decreased recoveries for both OXO and FLU. Recoveries were not affected by the rotation rate in the range studied (13000–17000 rpm).

Table 4. Mean recoveries^a and standard deviations (n = 3) obtained for oxolinic acid and flumequine using different operational conditions

Extraction time (min)	^b Recovery ± s (%)		Centrifugation time (min)	^c Recovery ± s (%)	
	OXO	FLU		OXO	FLU
5	69 ±1	71±2	5	68±1	61±1
10	89±3	91±1	10	89±2	92±4
15	100±2	100±5	15	100±2	100±5
30	99±1	99±1	30	100±1	98±3

^a200 mg of salmon spiked with 200 µg Kg⁻¹ of OXO and FLU; volume of supramolecular solvent = 400 µL; vibration motion = 2500 rpm, and centrifugation rate = 15000 rpm

^bCentrifugation time = 15 min

^cExtraction time = 15 min

The influence of matrix components on recoveries was investigated by extracting different amounts of fortified salmon samples. Table 5 shows the results obtained in this study. Recoveries were quantitative up to around 250 mg and then progressively decreased at higher sample amounts as a result of the deficient solvation of the sample at solvent volume/sample amount ratios below around 1.5. So, 200 mg of muscle samples is recommended for the extraction of the target antibiotics.

To evaluate the representativity of such low amount of salmon, the variances obtained for the measurement of OXO and FLU in 200 mg-subsamples (n = 11) of a certified reference material (CRM BCR[®] -725) were compared with those reported by the different laboratories (variances: 52–548 µg² Kg⁻² for OXO and 207–1918 µg² Kg⁻² for FLU; 500–1000 mg-subsamples) [42]. These laboratories used a wide range of

sample treatment procedures including extraction with methanol, dichloromethane, ethyl acetate, or basic solutions (alone or mixed with organic solvents); clean-up with SPE with C₁₈ materials, protein precipitation or several back extractions, and solvent evaporation. The variances obtained using the developed method (262 $\mu\text{g}^2 \text{Kg}^{-2}$ for OXO and 918 $\mu\text{g}^2 \text{Kg}^{-2}$ for FLU) were within the interval reported for the CRM material thus indicating that no problems of homogeneity were derived from the amount of sample treated by the recommended procedure in this manuscript. Additionally, salmon samples were fortified with OXO and FLU at the same concentration level than that certified for the CRM (i.e. 600 and 1170 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ for OXO and FLU, respectively) and analyzed. No statistically significant differences between the variances obtained from 200 mg of sample and CRM were observed by applying a Fisher test [43]. The experimental F-values were 2.27 and 1.02 for OXO and FLU, respectively, and were below the critical F-value (2.98; $n_1 = n_2 = 11$; significant level = 0.05).

Table 5. Mean concentrations of oxolinic acid and flumequine found in fortified salmon samples, and recoveries obtained, as a function of the amount of sample analyzed

Sample amount (mg)	Solvent volume/sample amount ($\mu\text{L mg}^{-1}$)	OXO		FLU	
		Concentration found ^a \pm s ^b ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Recovery ^a \pm s ^b	Concentration found ^a \pm s ^b ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Recovery ^a \pm s ^b
100	4.0	202 \pm 3	101 \pm 1	200 \pm 1	100.3 \pm 0.6
200	2.0	196 \pm 1	98.0 \pm 0.5	200 \pm 2	100 \pm 1
250	1.6	198 \pm 5	99 \pm 2	199 \pm 2	99 \pm 1
300	1.3	162 \pm 4	81 \pm 2	160 \pm 10	80 \pm 5
400	1.0	133 \pm 2	66 \pm 1	156 \pm 1	78.2 \pm 0.6

^aSamples spiked with 200 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ of OXO and FLU; Volume of supramolecular solvent = 400 μL

^b $n=3$

3.2. Analytical performance

Analytical performance of the developed method was assessed according to the guidelines established in the 2002/657/EC Commission Decision [37]. This Decision

provides rules for the analytical methods to be used in the determination of veterinary drug residues in animal products.

3.2.1. Sensitivity and linearity

Calibration curves for the target analytes were run using standard solutions prepared in the supramolecular solvent. Retention times for analytes, expressed in min, were 3.5 for OXO and 7.5 for FLU. No appreciable changes in these retention times were observed after at least 32 consecutive injections; their relative standard deviations ($n = 32$) being 1.7% and 1.1% for OXO and FLU, respectively. The sensitivities, expressed as the slope of the calibration curves, were $1.40 \pm 0.03 \text{ pg}^{-1}$ for OXO and $1.61 \pm 0.01 \text{ pg}^{-1}$ for FLU, and linearity was obtained in the intervals 0.1–20 and 0.06–20 ng (correlation coefficient = 0.9993 and 0.99990), respectively. The linear range was confirmed by the visual inspection of the plot residuals versus analyte amount [44]; the residuals were randomly scattered within a horizontal band and a random sequence of positive and negative residuals was obtained. The detection limits of the method, MDL [45], were calculated from six independent complete analyses (experimental procedure in Section 2.4) of salmon, sea trout, sea bass, gilt-head bream, megrim and prawn samples, containing no detectable levels of OXO or FLU, by using a signal-to-noise ratio of 3 (the ratio between the peak areas for each target analyte and peak area of noise). The quantitation limits of the method (MQL) were calculated in a similar way by using a signal-to-noise ratio of 10. The MDLs found for OXO were in the interval 2–3.6 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, except for salmon (6.6 $\mu\text{g Kg}^{-1}$), while those found for FLU ranged from 1.5 to 4.5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$. The MQLs for OXO and FLU ranged between 6.5 and 12 (22 for salmon) $\mu\text{g Kg}^{-1}$ and 5 and 15 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, respectively. Consequently, the method permitted the quantitation of OXO and FLU at concentrations far below the current MRLs established by the EU for these antibiotics in seafood; i.e. 100 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ for OXO and 600 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ for FLU (Council Directives 1356/2005 and 1181/2002, respectively).

3.2.2. Selectivity

The possible interference from matrix components was evaluated by two approaches. Firstly, six blank samples of each seafood tested, i.e. salmon, sea trout, sea bass, gilt-head bream, megrim and prawn, were analyzed and the chromatograms obtained were checked for any peaks in the regions of interest where the target analytes were expected to elute. Secondly, calibration curves for OXO and FLU were run from 200

mg samples fortified with known amounts of the target analytes (25–2000 $\mu\text{g Kg}^{-1}$), extracted using 400 μL of the supramolecular solvent and their slopes compared with those obtained from standards in supramolecular solvent. No peaks at the retention times of OXO and FLU appeared in the chromatograms obtained from the blank samples analyzed and no statistically significant differences between the slopes obtained from standards and those obtained from the samples were observed by applying a Student t test [46]. For example, the slopes ($n = 10$) obtained from salmon samples for OXO and FLU were $1.36 \pm 0.03 \text{ pg}^{-1}$ and $1.56 \pm 0.05 \text{ pg}^{-1}$, respectively and those obtained for standards in supramolecular solvent $1.40 \pm 0.03 \text{ pg}^{-1}$ for OXO and $1.61 \pm 0.01 \text{ pg}^{-1}$ for FLU. The experimental t-values were in the interval 0.03–1.42 and were below the critical t-value (3.36 significant level = 0.01).

Veterinary drug residues that can be encountered in seafood with the target analytes were also investigated as potentially interfering substances. Drugs tested include chemically related compounds, namely acidic (nalidixic acid) and piperazinyl (sarafloxacin and enrofloxacin) quinolones and other fluorescent substances used as antimicrobial agents in aquaculture, i.e. tetracyclines (chlortetracycline and oxytetracycline) and fencicols (florfenicol). The possible interference of these substances in the identification and quantification of OXO and FLU was assessed by analyzing blank salmon samples fortified with $1600 \mu\text{g Kg}^{-1}$ of foreign specie. Sarafloxacin, enrofloxacin, chlortetracycline, oxytetracycline and florfenicol did not provide any signal at the excitation and emission wavelengths used for the fluorescence detection of OXO and FLU (i.e. 325 and 360 nm, respectively) whereas the peak maximum corresponding to nalidixic acid separated 1.8 and 2.3 min from those corresponding to OXO and FLU, respectively. So, no interference from this acidic quinolone, both in the identification and quantitation of the target analytes, is expected to occur.

3.2.3. Precision

The precision of the method was assessed by applying the whole analytical process to eleven salmon samples spiked with $200 \mu\text{g Kg}^{-1}$ of AQAs. The repeatability, expressed as relative standard deviation was 3.6% for OXO and 2.3% for FLU.

3.2.4. Trueness

This parameter was evaluated by analyzing a Certified Reference Material (CMR, BCR® -725), consisting of lyophilised salmon tissue material, skin included, with a certified content of OXO and FLU of $600 \mu\text{g Kg}^{-1}$ (uncertainty = $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$) and $1170 \mu\text{g Kg}^{-1}$ (uncertainty = $210 \mu\text{g Kg}^{-1}$), respectively. The results obtained, expressed as mean values ($n = 11$) \pm the expanded uncertainty, estimated as $k \cdot s$ [47] (coverage factor $k = 2$ for a significant level of 0.05), were $580 \pm 32 \mu\text{g Kg}^{-1}$ for OXO and $1167 \pm 60 \mu\text{g Kg}^{-1}$ for FLU. The trueness calculated was -3.3% for OXO and -0.3% for FLU (according to the 2002/657/EC Commission Decision [37], the trueness of quantitative methods should be comprised between -20% and 10% for analyte concentrations equal or higher than $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$).

3.2.5. Ruggedness

Blank salmon samples fortified with $200 \mu\text{g Kg}^{-1}$ OXO and FLU were analyzed introducing deliberate small variations in the extraction method and their effect on the accuracy of the results was evaluated using the Youden approach [37]. Experimental conditions were varied in an order of magnitude that matched the deviations usually encountered among laboratories. The following conditions were tested: (a) THF used for preparation of the supramolecular solvent: 5% and 5.8%; (b) volume of solvent used for extraction: 340 and 460 μL ; (c) vibration motion: 13 and 17 min at a rate of 2100 and 2500 rpm; (d) centrifugation for 13 and 17 min at a rate of 13000 and 17000 rpm. The averages obtained at the two nominal values of each variable were compared and the standard deviation of the differences for all the variables, S_{Di} , was calculated for OXO ($S_{Di} = 7.2 \text{ ng g}^{-1}$) and FLU ($S_{Di} = 4.5 \text{ ng g}^{-1}$). The differences between these standard deviations and those of the method carried out under repeatability conditions were found to be not statistically significant by applying a Fisher test [43]. The calculated F-values were 3.78 and 2.11 and were below the critical t-value (4.24), being significance established at 0.05 levels. Therefore the method is considered robust against the chosen modifications.

3.2.6. Stability

The stability of the analytes was tested both in standard solutions and samples. Stock solutions containing 100 mg L⁻¹ of OXO or FLU were stable for one month as they were stored at 4° C and working solutions containing 1.5 mg L⁻¹ of both analytes were stable for 12 h at room temperature. To assess the stability of OXO and FLU in the samples, a blank salmon sample was divided into aliquots and each one was fortified with 200 µg Kg⁻¹ OXO and FLU. Then, the aliquots were stored at -20° C and analyzed after one, two and three weeks. Under these conditions, the analytes were stable for two weeks. After three weeks of storage, the concentration of both OXO and FLU in the sample decreased to about 150 µg Kg⁻¹.

3.2.7. Decision limit and detection capability

The decision limit (CC_α) means the limit at and above which it can conclude with an error probability of α that a sample is not compliant. It was established by analyzing 20 blank salmon samples fortified with OXO and FLU at the permitted limit (i.e. 100 and 600 µg Kg⁻¹, respectively), and it was calculated from the concentration at the permitted limit plus 1.64 times the standard deviation of the blank salmon sample measurements (α = 5%). The decision limits obtained for OXO and FLU were 104 and 611 µg Kg⁻¹, respectively. The detection capability (CC_β) is the smallest content of the substance that may be detected, identified and/or quantified in a sample with an error probability of β. It was calculated as the value of the decision limit plus 1.64 times the standard deviation of the measurements obtained from the analysis of 20 blank salmon samples fortified with 104 µg Kg⁻¹ OXO and 611 µg Kg⁻¹ FLU (β = 5%). The obtained CC_β values were 109 µg Kg⁻¹ for OXO and 622 µg Kg⁻¹ for FLU.

3.3. Analysis of aquaculture seafood

A variety of aquaculture fishes (salmon, sea trout, sea bass, gilt-head bream and megrim) and shellfishes (prawn) were bought in supermarkets in Córdoba (Spain) and their muscles spiked at two concentration levels: (1) 100 µg Kg⁻¹ OXO and 600 µg Kg⁻¹ FLU, the current European MRLs for these antibiotics in seafood, and (2) 50 µg Kg⁻¹ OXO and FLU, concentrations below these MRLs. In parallel, non-fortified muscle samples were also analyzed. No detectable concentrations of FLU were found in any of the non-fortified samples. OXO was only detected in the megrim

sample at a concentration of $37 \pm 2 \mu\text{g Kg}^{-1}$, which is below the current European MRL for this antibiotic and above the MQL of the developed method for this matrix ($8 \mu\text{g Kg}^{-1}$). The identification of the analyte was confirmed by co-chromatography comparing the retention time and the peak width at half-maximum height obtained for OXO from non-spiked and spiked samples. Fig. 2 shows the chromatograms obtained from the megrim sample (A) non-fortified and fortified with (B) $50 \mu\text{g Kg}^{-1}$ OXO and FLU or (C) $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$ OXO and $600 \mu\text{g Kg}^{-1}$ FLU. The retention times obtained for OXO from the non-fortified and the two fortified samples were within a margin of 2% (2002/657/EC Commission Decision establishes a margin of 5% for the identification of analytes by co-chromatography [37]), and the widths at half-maximum height of the peaks recorded from the spiked samples were between 95% and 106% of the corresponding widths for the non-spiked sample (2002/657/EC Commission Decision establishes a range of 90–110% [37]). No detectable concentrations of OXO were found in the further non-fortified samples analyzed.

The results obtained for the fortified seafood samples are shown in Table 6. Both the concentrations of analytes and recoveries were expressed as the mean value of three independent determinations, besides their corresponding standard deviations. Recoveries and their relative standard deviations were in the intervals 99–102% and 0.2–5%, respectively.

4. Conclusions

Supramolecular solvents consist of amphiphilic nanostructures that provide multiple binding sites and regions of different polarity. These outstanding properties make them suitable to extract a variety of analytes with high efficiency and render them ideal for microextractions. In this research, the suitability of supramolecular solvents to be used in solid sample microextractions has been firstly proved from a practical point of view through the development of a reliable, rapid and low-cost method for the determination of two widely used quinolone antibiotics in fishes and shellfishes. The proposed sample treatment highly surpasses to the previously reported ones in: (1) extraction efficiency; recoveries are quantitative and independent of the composition of sample matrix, (2) simplicity; extractions are performed in a single step and neither clean-up nor solvent evaporation is required and (3) sample throughput; because of the short time spent in the sample treatment (about 30 min) and the possibility of treating several

samples simultaneously. The high capability of DeA reverse micelle-based solvents to extract OXO and FLU residues from aquaculture products can be explained on the basis of the formation of DeA-OXO and DeA-FLU mixed aggregates through hydrophobic interactions and hydrogen bonding. Most veterinary drugs are amphiphilic and contain hydrogen bond donors (OH) and/or acceptors in their molecular structures, therefore the use of DeA reverse micelle-based solvents is expected to be a suitable general strategy for the extraction of drug residues (e.g. antibiotics belonging different structural groups, anti-inflammatories, steroid hormones, etc.) from products of animal origin.

Table 6. Mean concentrations and recoveries, along with their respective standard deviations, obtained from the analysis of OXO and FLU in fortified seafood samples

Sample	Concentration found ^a ± ^b (µg Kg ⁻¹)		Recovery± ^b (%)	
	OXO	FLU	OXO	FLU
Fishes				
Salmon	49.8 ± 0.4 ^c	50.4 ± 0.9 ^c	99.6 ± 0.8 ^c	101 ± 2 ^c
	100 ± 1 ^d	594 ± 4 ^d	100 ± 1 ^d	99.1 ± 0.7 ^d
Sea trout	50 ± 2 ^c	50.5 ± 0.7 ^c	100 ± 3 ^c	101 ± 1 ^c
	100 ± 1 ^d	597 ± 4 ^d	100 ± 1 ^d	99.5 ± 0.6 ^d
Sea bass	49 ± 2 ^c	49.9 ± 0.7 ^c	99 ± 3 ^d	100 ± 1 ^d
	100 ± 3 ^d	609 ± 4 ^d	100 ± 3 ^d	101.4 ± 0.7 ^d
Gilt-head breem	50.8 ± 0.5 ^c	50 ± 1 ^c	102 ± 1 ^c	100 ± 2 ^c
	102 ± 2 ^d	605 ± 1 ^d	102 ± 2 ^d	100.8 ± 0.2 ^d
Megrim	87 ± 3 ^c	50.6 ± 0.7 ^c	99 ± 2 ^c	101 ± 1 ^c
	140 ± 7 ^d	609 ± 3 ^d	103 ± 5 ^d	101.5 ± 0.6 ^d
Seafood				
Prawn	51 ± 3 ^c	50 ± 2 ^c	102 ± 5 ^c	100 ± 3 ^c
	100 ± 2 ^d	608 ± 1 ^d	100 ± 2 ^d	101.4 ± 0.2 ^d

^aMean of three independent determinations

^bStandard deviation

^cAbout 200 mg of sample spiked with 50 µg Kg⁻¹ OXO and 50 µg Kg⁻¹ FLU

^dAbout 200 mg of sample spiked with 100 µg Kg⁻¹ OXO and 600 µg Kg⁻¹ FLU

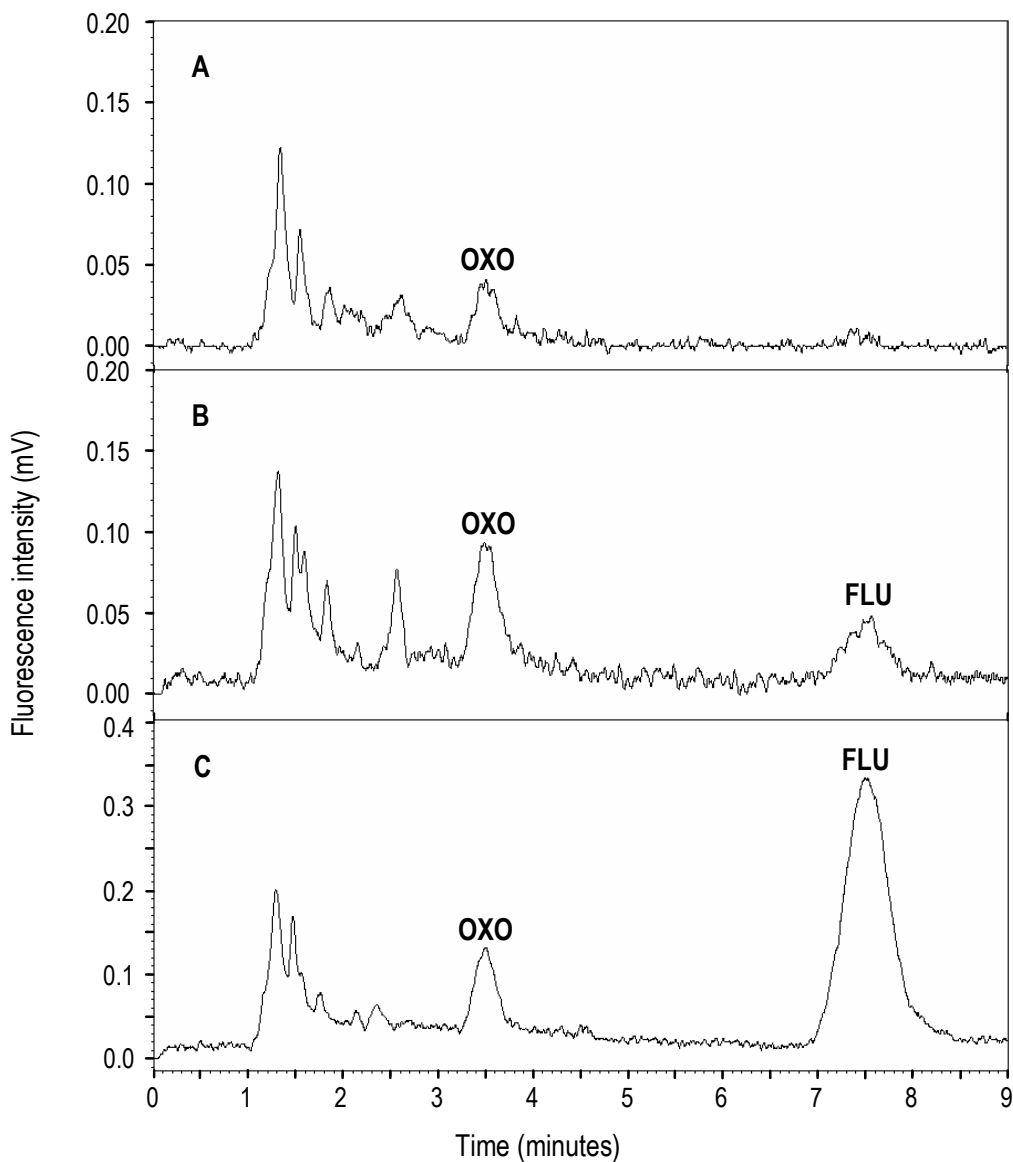


Fig. 2. Chromatograms obtained from 200 mg of megrim sample (A) non-spiked and (B and C) spiked with the target analytes at two concentration levels: (B) $50 \mu\text{g Kg}^{-1}$ OXO and $50 \mu\text{g Kg}^{-1}$ FLU and (C) $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$ of OXO and $600 \mu\text{g Kg}^{-1}$ FLU. Chromatographic conditions as specified in Section 2.4.3.

Acknowledgments

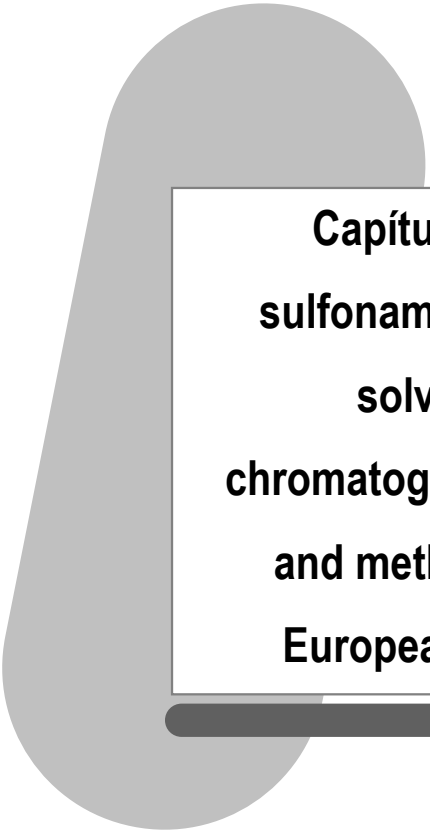
The authors gratefully acknowledge financial support from Spanish MICINN (Project CTQ2008-01068). E. M. Costi acknowledges the Andalusian CICYE for a postgraduate fellowship.

References

- [1] Y. Picó, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 821.
- [2] A.A.M. Stolker, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 15.
- [3] A. Gentili, D. Perret, S. Marchese, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 704.
- [4] T.A. McGlinchey, P.A. Rafter, F. Regan, G.P. McMahon, *Anal. Chim. Acta* 624 (2008) 1.
- [5] M. Castro-Puyana, A.L. Crego, M.L. Marina, *Electrophoresis* 29 (2008) 274.
- [6] M. Hernández, F. Borrull, M. Calull, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 416.
- [7] J.A. Hernández-Arteseros, J. Barbosa, R. Compañó, M.D. Prat, *J. Chromatogr. A* 945 (2002) 1.
- [8] H. Oka, Y. Ito, H. Matsumoto, *J. Chromatogr. A* 882 (2000) 109.
- [9] D.G. Kennedy, R.J. McCracken, A. Cannavan, S.A. Hewitt, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 77.
- [10] F.J. Lara, A.M. García-Campana, F. Ales-Barrero, J.M. Bosque-Sendra, *Electrophoresis* 29 (2008) 2117.
- [11] P.L. Buldini, L. Ricci, J.L. Sharma, *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 47.
- [12] M. García-López, P. Canosa, I. Rodríguez, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 391.
- [13] A.M. Ballesteros Gómez, S. Rubio, M.D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 530.
- [14] IUPAC Compendium of Chemical Terminology 31 (1972) 611.
- [15] W.L. Hinze, E. Pramauro, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 24 (1993) 133.
- [16] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, C. García-Pinto, E. Fernández Laespada, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 251.
- [17] S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 470.
- [18] T. Saitoh, W.L. Hinze, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2520.
- [19] X. Jin, M. Zhu, E.D. Conte, *Anal. Chem.* 71 (1999) 514.
- [20] I. Casero, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4519.

-
- [21] F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 78 (2006) 7229.
- [22] F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7473.
- [23] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 998 (2003) 143.
- [24] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 962 (2002) 1.
- [25] C. García Pinto, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, *Anal. Chem.* 66 (1994) 874.
- [26] A. García-Prieto, L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 617 (2008) 51.
- [27] A. García-Prieto, L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Food Addit. Contam.* 26 (2009) 265.
- [28] E. Jiménez-Lozano, I. Marqués, D. Barrón, J.L. Beltrán, J. Barbosa, *Anal. Chim. Acta* 464 (2002) 37.
- [29] Council Directives (EC) 1356/2005 and 1181/2002 amending Annex I of Council Regulation (EEC) 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin.
- [30] V. Andreu, C. Blasco, Y. Pico, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 534.
- [31] J.A. Hernández-Arteseros, J. Barbosa, R.R. Compañó, M.D. Prat, *J. Chromatogr. A* 954 (2002) 1.
- [32] B. Roudaut, J.C. Yorke, *J. Chromatogr. A* 780 (2002) 481.
- [33] M. Ramos, A. Aranda, E. García, T. Reuvers, H. Hooghuis, *J. Chromatogr. A* 789 (2003) 373.
- [34] C.M. Karbiwnyk, L.E. Carr, S.B. Turnipseed, W.C. Andersen, K.E. Miller, *Anal. Chim. Acta* 596 (2007) 257.
- [35] N. Van Hool, K. De Wasch, L. Okerman, W. Reybroeck, S. Poelmans, H. Noppe, H. De Brabander, *Anal. Chim. Acta* 529 (2005) 265.
- [36] L. Johnston, L. Mackay, M. Croft, *J. Chromatogr. A* 982 (2002) 97.
- [37] Commission Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.
- [38] A. Balleteros-Gómez, F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 603 (2007) 51.
- [39] X. Wu, J. Zheng, H. Ding, D. Ran, W. Su, Y. Song, J. Yang, *Anal. Chim. Acta* 596 (2007) 16.
- [40] Nutrition Facts Database (version 0.9.3.5, 2008).
- [41] <http://revista.consumer.es/web/es/19990601/actualidad/analisis131221-2.php>.

-
- [42] I. Christensen, G.N. Kramer, M. Ricci, M. Dabrio, B.M. Gawlik, European Commission, Directorate-General Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM), The certification of the contents (mass fractions) of flumequine and oxolinic acid in freeze-dried salmon tissue, BCR-725, EUR 21181/EN, 2004.
- [43] J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, fifth ed., Pearson Education, Harlow, 2005, p. 49.
- [44] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. de Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A. Data Handling in Science and Technology Series, 20A*, Elsevier, Amsterdam, 1997, p.179.
- [45] M. Thompson, S.L.R. Ellison, R. Wood, *Pure Appl. Chem.* 74 (2002) 835.
- [46] L. Cuadros, A.M. García, F. Alés, C. Jiménez, M. Román, *J. AOAC Int.* 78 (1995) 471.
- [47] ISO/IEC Guide 98: 1995, *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM)*.



**Capítulo 4. Multiresidue analysis of
sulfonamides in meat by supramolecular
solvent microextraction, liquid
chromatography and fluorescence detection
and method validation according to the
European Union 2002/657/EC directive**

Journal of Chromatography A, 2010, submitted for publication



JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY A

Multiresidue analysis of sulfonamides in meat by supramolecular solvent microextraction, liquid chromatography and fluorescence detection and method validation according to the European Union 2002/657/EC directive

Esther María Costi, María Dolores Sicilia, Soledad Rubio*

Department of Analytical Chemistry. Faculty of Sciences, University of Córdoba. Edificio Anexo Marie Curie.
Campus de Rabanales, 14071-Córdoba.Spain

Abstract

A multiresidue method was described for determining eight sulfonamides, SAs (sulfadiazine, sulfamerazine, sulfamethoxypyridazine, sulfachloropyridazine, sulfadoxine, sulfamethoxazole, sulfadimethoxine and sulfaquinoxaline) in animal muscle tissues (pork, chicken, turkey, lamb and beef) at concentrations below the maximum residue limit (100 $\mu\text{g Kg}^{-1}$) set by the European Commission. The method was based on the microextraction of SAs in 300 mg-muscle samples with 1 mL of a supramolecular solvent made up of reverse micelles of decanoic acid (DeA) and posterior determination of SAs in the extract by LC/fluorescence detection, after in situ derivatization with fluorescamine. Recoveries were quantitative (98-109%) and matrix-independent, no clean-up or concentration of the extracts was required, the microextraction took about 30 min and several samples could be simultaneously treated. Formation of multiple hydrogen bonds between the carboxylic groups of the solvent and the target SAs (hydrogen donor and

acceptor sum between 9 and 11) were considered as the major forces driving microextraction. The method was validated according to the European Union 2002/657/EC directive. Analytical performance in terms of sensitivity, linearity, selectivity, trueness, precision, stability of SAs, decision limit and detection capability were determined. Quantitation limits for the different SAs ranged between 12 and 44 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, they being nearly independent of matrix composition. Repeatability and reproducibility, expressed as relative standard deviation, were in the ranges 1.8-3.6% and 3.3-6.1%. The results of the validation process proved that the method is suitable for determining sulfonamide residues in surveillance programs.

Keywords: Microextraction, supramolecular solvent, sulfonamides, meat, multiresidue analysis, liquid chromatography, fluorescence detection

1. Introduction

Sulfonamides (SAs) are among the most used veterinary drugs owing to their broad-spectrum antimicrobial activity, effectiveness as growth promoters of livestock and low price [1]. The possible presence of residues of these drugs in edible animal products is of major concern because they can cause serious health problems in humans, such as allergic or toxic reactions [2, 3]. They are frequently detected in a variety of food-producing animals [4-6] at concentrations above the maximum residue limit (MRL) set by different countries ($100 \mu\text{g Kg}^{-1}$ for total SAs [7-9]).

Quantification of these wide polarity range compounds in edible animal products is a challenging task. The technique most extensively used for this purpose is liquid chromatography (LC) coupled to mass spectrometry (MS) [1, 4, 10-12] or fluorescence (FL) detection [13-16]. Matrix-matched calibration and precolumn derivatization are respectively used with LC/MS and LC/FL and although both techniques are considered as reference for many matrices, a quick, widely applicable sample treatment is lacking.

Most sample handling procedures reported for SAs involve the use of repetitive extractions followed by clean up and concentration steps. Because of the absence of suitable solvents to quantitatively extract such wide polarity range analytes, extraction with large solvent volumes (typically 15-140 mL per sample [4, 5, 10, 13-15, 17, 18]) assisted by auxiliary energies (i.e. ultrasounds [5,19], microwaves [20] or pressure [6]) is a common strategy. The most frequently used solvent is acetonitrile, alone or in the presence of salts. Alternative solvents such as supercritical fluids have been also reported [21]. Clean-up is usually carried out by liquid-liquid (LLE) [4, 5, 10, 13-15] and/or solid phase (SPE) [6, 10, 17] extraction, while preconcentration is generally achieved by solvent evaporation. Simplified sample treatments such as matrix solid-phase dispersion extraction (MSPDE) [22], dispersive SPE [16] or liquid phase microextraction (LPME) [21] permit to reduce analysis time and solvent consumption (5-7 mL). However, many of the above approaches have been optimized and validated for a unique food matrix (i.e. chicken or pork muscle [6, 16, 19, 22, 23]) and others provide low and/or matrix-dependent recoveries [5, 10, 14, 18].

This article deals with the assessment of supramolecular solvents (SUPRASs) for the extraction of sulfonamide residues in edible animal tissues in order to develop a


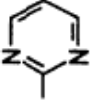
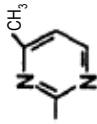
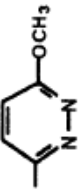
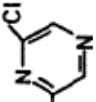
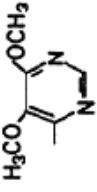
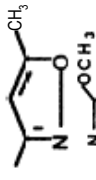
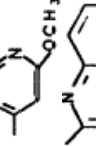

quick, simple and efficient sample treatment procedure that along with a simple technique, LC-FL, provides a low-cost method able to fulfil the requirements of the 2002/657/EC directive.

SUPRASs are nano-structured liquids generated from amphiphiles through a sequential, self-assembly process occurring on two scales, molecular and nano [24]. Basic components of SUPRASs are water and amphiphiles arranged in ordered structures (e.g. aqueous or reverse micelles and vesicles). These solvents are well-known to the analytical community and have been used for long years in extraction processes under different names (e.g. cloud point technique [25-27] or coacervates [28, 29]). The outstanding properties of SUPRASs for extraction processes derive from the special structure of the ordered aggregates that constitute them and the large concentration of amphiphiles in the solvent (0.1-1 mg μL^{-1}). Both features determine the high capability of solubilisation of SUPRASs for a variety of solutes, which renders them ideal for multiresidue analysis in the environmental and agrifood fields, an outstanding property hardly explored so far.

Application of SUPRAS made up of non-ionic micelles to the extraction of hydrophobic organic compounds and metals, mainly from environmental and biological liquid samples, is a consolidated area and excellent published reviews compile this information [30-33]. Effective extraction of polar compounds by SUPRASs depends on the nature of surfactant polar groups and the type of interactions they can establish with analytes (viz. ionic, hydrogen bonding, π -cation, π - π , etc.) [30]. A great deal of research has been conducted in the last decade related to the extraction of polar compounds by SUPRAS; the major advances being obtained with the development of SUPRASs based on ionic surfactants and other aggregates that aqueous micelles (viz. reverse micelles and vesicles) [34, 35]. Applications include the extraction of pesticides [36, 37], surfactants [38], bioactive compounds [28], dyes [39], endocrine disruptors [40, 41] and phenols [42], among others. Only a few applications have been devoted to the extraction of residues in food (viz. pesticides in fruits [43, 44] and cereals [45, 46], endocrine disruptors in canned foods [47, 48], drug residues in seafood [49], contaminants in drinks [24, 50-52]) and most of them involve the extraction of 1-2 analytes.

In this work, a supramolecular solvent made up of reverse micelles of decanoic acid (DeA) [35] was selected for the extraction of eight sulfonamide residues in meat. Table 1 shows their molecular structures and physico-chemical properties. The DeA

Table 1. Chemical structure, octanol-water partition coefficients ($\log K_{ow}$), ionization constants ($pK_{a,1}$ and $pK_{a,2}$) and number of donor and acceptor groups for sulfonamides

General structure	Sulfonamide antibiotic	R	^a $\log K_{ow}$	^b $pK_{a,1}$	^b $pK_{a,2}$	^b Hydrogen donor and acceptor sum
	Sulfadiazine (SD)		-0.09	1.64	6.50	9
	Sulfamerazine (SM)		0.14	1.64	6.98	9
	Sulfametoxypyridazine (SMP)		0.32	2.18	7.19	10
	Sulfachloropyridazine (SCP)		0.31	1.88	5.90	9
	Sulfadoxine (SDX)		0.70	1.59	6.16	11
	Sulfamethoxazole (SMT)		0.89	1.39	5.81	9
	Sulfadimethoxine (SDM)		1.63	1.30	6.21	11
	Sulfaquinoxaline (SQ)		1.68	1.77	5.65	9

^aObtained from the ChemIDplus Lite database, National Institute of Health (USA). Available from: <http://toxnet.nlm.nih.gov>.

^bCalculated using the Advanced chemistry Development (ACD/Labs) Software V8.14 for Solaris

reverse micelle-based SUPRAS was expected to provide high extraction efficiencies for SAs on the basis of: 1) the strong hydrogen bonds that can be established between sulfonamides and carboxylic groups and 2) the high concentration of DeA in the SUPRAS (0.76 mg μL^{-1}). The study included the optimization of the variables affecting the efficiency of the extraction and the yield of the derivatization reaction. The proposed method was validated following the guidelines established in the 2002/657/EC Commission Decision [53], and SAs were determined in different edible animal tissues (muscle of pork, chicken, turkey, lamb and beef). The main results obtained are presented and discussed below.

2. Experimental

2.1. Chemicals

All chemicals were of analytical reagent-grade and were used as supplied. Phosphoric acid and LC-grade acetonitrile, methanol and tetrahydrofuran (THF) were obtained from Panreac (Barcelona, Spain) and decanoic acid (DeA) from Sigma (St. Louis, MO). Ultra-high-quality water was obtained from a Mili-Q water purification system (Millipore, Madrid, Spain). A fluorescamine solution (5%, w/v) was prepared by dissolving the reagent [Fluka (Buchs, Switzerland)] in acetone. This solution was stable for at least 3 months. Sulfonamides [sulfadiazine (SD), sulfamerazine (SM), sulfamethoxypyridazine (SMP), sulfachloropyridazine (SCP) sulfadoxine (SDX), sulfamethoxazole (SMT), sulfadimethoxine (SDM) and sulfaquinoxaline (SQ)] were supplied by Riedel-de Haën (Seelze, Germany). Stock solutions of 100 mg L^{-1} individual SAs were prepared in methanol and stored at -20°C . A 2 mL-working solution containing 5 mg L^{-1} of each SA was daily prepared by appropriate dilution of the stock solutions with the supramolecular solvent. Six calibration solutions, containing amounts of SAs in the range 2-360 ng were prepared in 0.5 mL-volumetric flasks from the working solution by dilution with the supramolecular solvent.

2.2. Apparatus

The liquid chromatographic system used consisted of a TermoQuest Spectra System (San Jose, CA, USA) furnished with a P4000 quaternary pump, a SCM 1000 vacuum membrane degasser, an AS3000 auto-sampler and a FL3000 fluorescence detector. The

stationary-phase column was a Kromasil C₈ column (5 μm, 250 mm x 4.0 mm) from Analisis Vinicos (Tomelloso, Spain). A homogenizer-disperser Ultra-Turrax T25 Basic from Ika (Werke, Germany), a vortex-shaker REAX Top equipped with an attachment (ref. 549-01000-00) for 10 microtubes from Heidolph (Schwabach, Germany) and a high speed brushless centrifuge MPW-350R equipped with an angle rotor 36x2.2/1.5 mL (ref. 11462) from MPW Med-Instruments (Warschaw, Poland) were used for sample preparation. A magnetic stirrer Basicmagmix from Ovan (Barcelona, Spain) and a digitally regulated centrifuge Mixtasel equipped with an angle rotor 4x100 mL (ref. 7001326) from JP-Selecta (Abrera, Spain) were used for supramolecular solvent production.

2.3. Supramolecular solvent production

The following procedure, which permits to obtain a supramolecular solvent volume (~8.5 mL) able to treat 8 meat samples, was routinely followed. Decanoic acid (6.5 g) was dissolved in THF (4.2 mL) in a 100 mL-glass centrifuge tube. Then, 80 mL of a 10 mM hydrochloric acid aqueous solution was added. The mixture was magnetically stirred for 5 min, time in which the supramolecular solvent spontaneously formed into the bulk solution. Then, the suspension was centrifuged at 3500 rpm for 10 min to speed solvent separation up, which is less dense than water. Next, it was withdrawn using a 10 mL-syringe, transferred to a hermetically closed glass vial to avoid THF losses and stored at 4 °C. The volume of solvent obtained can be adjusted at will by choosing an appropriate, constant DeA/THF/water proportion.

2.4. Determination of SAs in meat samples

2.4.1. Sample preparation

Meat samples (pork, chicken, turkey, lamb and beef) were bought in local supermarkets and stored at -20°C until analysis. After thawing, about 300 g of sample was chopped and homogenized using a homogenizer-disperser. Then, portions of about 300 mg were taken for analysis and recovery experiments, which were performed in triplicate. Spiking of chopped samples (300 mg) was done by adding volumes in the range 4-230 μL of a solution containing SAs (3 mg L⁻¹ each) in methanol. The spiked samples were allowed to stand at room temperature for 15 min before analysis. Spiking for sample representativity studies was made using 4 g aliquot samples.

2.4.2. Microextraction of SAs

A portion (about 300 mg) of chopped sample and 1 mL of supramolecular solvent were mixed in a 2 mL-microtube Safe-Lock from Eppendorf Ibérica (Madrid, Spain). A micro PTFE-coated bar (3x10 mm, Pobel, Madrid, Spain) was introduced in the microtube to favour sample dispersion during extraction, which was made by sample vortex-shaken at 2500 rpm for 30 min. Then, the mixture, thermostated at 15°C, was centrifuged at 15000 rpm (16720xg) for 10 min. The supramolecular extract was withdrawn using a micropipette and transferred to an autosampler vial.

2.4.3. Derivatization

Calibration solutions or supramolecular extracts (140 µL) containing amounts of SAs in the interval 0.6-100 ng and 60 µL of fluorescamine solution (5%, w/v) were placed in auto-sampler vials. Then, they were vortex-shaken at 2500 rpm for 10 s, placed in the auto-sampler and allowed to stand at room temperature for 70 min before injecting an aliquot (30 µL) of the resulting solution into the liquid chromatograph.

2.4.4. Liquid chromatography-fluorescence detection

Derivatized SAs were separated by LC and quantified by fluorescence measurements performed at 405/490 nm excitation/emission wavelengths. The mobile phase consisted of acetonitrile/concentrated H₃PO₃ (99.91:0.09, v/v) (A) and 15 mM of phosphate buffer (pH = 3) (B). Two sequential isocratic elution steps were used: 1) 0-32 min: 25% A and 75% B for elution of matrix components and 2) 32-65 min: 35% A and 65% B for separation of SA derivatives. After each run, initial elution conditions were restored for 5 min before the next injection. The flow-rate of the mobile phase and the temperature of the stationary-phase column were kept constant at 1.1 mL min⁻¹ and 40°C, respectively. Calibration curves were run from six calibration solutions.

3. Results and discussion

3.1. Supramolecular solvent-based microextraction of SAs

Reverse micelles of DeA in THF self-assemble in the presence of water undergoing phase separation from the bulk homogeneous solution as an immiscible liquid made up of large reverse micelles, THF and water. The SUPRAS is produced within a wide range of THF/water ratios (e.g. from 5/95 to 80/20, v/v) and DeA concentrations below 8% (w/v). Reverse micelles are only formed from decanoic acid ($pK_a = 4.8 \pm 0.2$), so maximal production of this solvent occurs at pHs below 4.

SUPRAS composition mainly depends on the THF/water ratio (v/v) in the bulk solution. It keeps constant at a given THF/water ratio, independently of the amount of DeA in the mixture. The volume of solvent produced is linearly and exponentially dependent on the amount of decanoic acid and percentage of THF, respectively. So, the amount of DeA in the solvent decreases as the concentration of THF increases (e.g. $0.76 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$ and $0.21 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$ for 5 and 30% of THF, respectively [49]).

3.1.1. Optimization

The extraction of SAs from meat samples involves the breaking down of hydrogen bonds between the amide groups of matrix proteins and the amine moiety of analytes and the solubilisation of free SAs in the SUPRAS based on hydrogen bond and hydrophobic interactions.

Optimization of SUPRAS extraction was carried out using pork tissue (100-300 mg) spiked with the eight SAs at a concentration of $200 \text{ } \mu\text{g Kg}^{-1}$ each. Experiments were made in triplicate. Pork was selected as a sample model on the basis of its representative protein [16.9 % (w/w)] and high fat [21.2 % (w/w)] contents; the percentages of protein and fat in the samples analysed were within the intervals 16.6-21.8% and 2.9-23.4%, respectively [54]. Selection of the optimal conditions was based on the recoveries and method quantitation limits (MQLs) obtained. The level of interferences extracted in the supramolecular solvent was also taken into account. MQLs were calculated from the instrumental quantitation limits (80 pg for SD and SMT, 90 pg for SM and SDX, and 100 pg, 150 pg, 190 pg and 250 pg for SDM, SCP, SMP and SQ, respectively), the volume of

supramolecular solvent used for extraction, the recoveries obtained and the weight of sample used for analysis. The variables investigated were: composition and volume of extractant, pH, time required to reach equilibrium conditions and time of centrifugation necessary to obtain free-particle extracts. The representativity of the amount of sample selected for meat analysis, after applying the sample treatment recommended in Section 2.4.1, was also evaluated.

SUPRAS of different composition were prepared from a constant concentration of DeA [8% (w/v)] and variable THF/water ratios (5/95 to 30-70 v/v) and a volume of 1 mL was used to extract SAs from 300 mg-pork samples. The concentration of DeA in these solvents ranged between 0.21 and 0.76 mg μL^{-1} . SUPRAS composition was found not to influence SA recoveries however, extracts became dirtier as the THF in the SUPRAS increased. The solvent providing the cleanest extracts was that produced from a 5/95 v/vTHF/water ratio, and therefore, it was selected for further studies.

Table 2 shows the recoveries and MQLs obtained for SAs as a function of the volume of SUPRAS used for extraction. Recoveries were nearly 100% for all the SAs and MQLs ranged between 13 and 40 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ (i.e. lower than the MRLs legislated for meat, 100 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ [7-9]) as 1 mL of SUPRAS was used. So, this volume was selected as optimal.

The pH had not influence on SA extraction. This parameter was investigated by producing the supramolecular solvent from water solutions in which the pH was adjusted between 1 and 4 with hydrochloric acid. Then, 1 mL aliquots of these solvents were used for extraction. Both recoveries and MQLs kept constant in the interval investigated.

Table 3 shows the influence of the time of extraction and centrifugation on SA recoveries. About 30 min of extraction were required to achieve recoveries nearly 100% for all sulfonamides. Effective separation of particles from the SUPRAS was reached after centrifugation for 10 min.

To evaluate the representativity of the amount of pork sample used for analysis, the variances obtained for the measurement of SAs in 300 mg-pork subsamples fortified with 100 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ of each SA were compared with those obtained from the measurement of 300 mg-aliquots taken from a 4 g pork sample spiked at the same concentration level. No statistically significant differences between both variances were observed by applying

a Fisher test [55]. The experimental F-values were in the interval 1.09-1.59 and were below the critical F-value (2.98, $n_1=n_2=11$, significant level = 0.05).

3.2. Derivatization of SAs in the SUPRAS

Sulfonamides were derivatized in the SUPRAS extract using fluorescamine [13]. Because of both the concentration of reagent and time necessary to obtain maximal product yield have been known to highly depend on the composition of the reaction medium [13, 14, 56], we studied how these variables behave in the SUPRAS. Experiments performed to select the optimal concentration of fluorescamine were as follows: variable volumes of fluorescamine solution (5%, w/v) in acetone were added to standard solutions containing 60 ng of each SA dissolved in the supramolecular solvent (total fluorescamine+standard solution volume = 200 μ L). After 70 min of reaction, the mixture was analysed by LC-FL. Figure 1 shows the variation of the mean peak areas ($n=3$) obtained as a function of the concentration of fluorescamine. Peak areas increased as the concentration of fluorescamine did up to 1.5% (w/v) and at higher reagent amounts, they slightly decreased probably due to quenching effects produced by fluorescamine hydrolysis products [56]. A reagent concentration of 1.5% (w/v) was selected as optimum because it provides the maximum sensitivity for the determination of all the analytes tested.

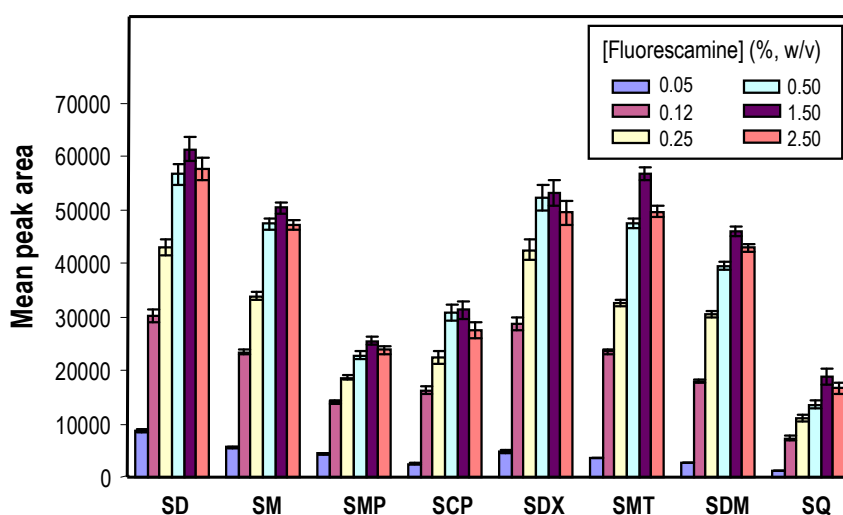


Figure 1. Effect of the fluorescamine concentration on the mean peak areas ($n=3$) obtained for the target analytes. [SAs] = 300 μ g L⁻¹; reaction time = 70 min; room temperature.

Table 2. Mean recoveries and method quantification limits obtained for sulfonamides as a function of the volume of supramolecular solvent used for extraction (Part 1)

Sulfonamide	Volume of supramolecular solvent (mL)			
	0.4	0.6		
	Recovery ^a ± s ^b (%)	MQL (µg Kg ⁻¹)	Recovery ^a ± s ^b (%)	MQL (µg Kg ⁻¹)
SD	44±1	11	50±1	15
SM	64±2	9	76±2	11
SMP	60±1	20	75±3	24
SCP	54±1	17	69±6	21
SDX	77±1	7	87±6	10
SMT	65±1	8	74±4	10
SDM	73±1	9	88±1	11
SQ	63±1	25	76±7	31

^a300 mg of pork spiked with 200 µg Kg⁻¹ of each SA

^bStandard deviation, n = 3

Table 2. Mean recoveries and method quantitation limits obtained for sulfonamides as a function of the volume of supramolecular solvent used for extraction (Part 2)

Sulfonamide	Volume of supramolecular solvent (mL)		Recovery ^a ± s ^b (%)	MQL (µg Kg ⁻¹)	Recovery ^a ± s ^b (%)	MQL (µg Kg ⁻¹)
	0.8	1.0				
SD	81±1	12	104±4	13	104±4	13
SM	104±8	11	102±2	14	102±2	14
SMP	103±9	24	101±2	30	101±2	30
SCP	91±12	21	104±3	24	104±3	24
SDX	100±1	11	101±1	14	101±1	14
SMT	105±1	10	101±3	13	101±3	13
SDM	105±4	13	103±4	16	103±4	16
SQ	93±8	34	98±1	40	98±1	40

^a300 mg of pork spiked with 200 µg Kg⁻¹ of each SA

^bStandard deviation, n = 3

Table 3. Recovery (mean value \pm standard deviation)^a obtained for sulfonamides using different operational conditions.

Sulfonamide	^b Extraction time (min)				^c Centrifugation time (min)			
	5	15	30	45	5	10	15	
SD	82 \pm 2	88 \pm 1	104 \pm 4	103 \pm 2	83 \pm 1	104 \pm 4	104 \pm 3	
SM	78 \pm 1	87 \pm 4	102 \pm 2	104 \pm 2	95 \pm 1	102 \pm 2	103 \pm 2	
SMP	69 \pm 4	92 \pm 1	101 \pm 2	100 \pm 1	94 \pm 1	101 \pm 2	101 \pm 2	
SCP	77 \pm 2	100 \pm 3	104 \pm 3	100 \pm 2	95 \pm 1	104 \pm 3	104 \pm 5	
SDX	77 \pm 2	94 \pm 1	101 \pm 1	100 \pm 2	92 \pm 1	101 \pm 1	106 \pm 4	
SMT	76 \pm 1	93 \pm 2	101 \pm 3	102 \pm 1	95 \pm 1	101 \pm 3	102 \pm 3	
SDM	78 \pm 1	96 \pm 2	103 \pm 4	103 \pm 2	98 \pm 1	103 \pm 4	99 \pm 2	
SQ	84 \pm 3	96 \pm 2	98 \pm 1	99 \pm 1	88 \pm 2	98 \pm 1	98 \pm 3	

^a300 mg of pork spiked with 200 μ g Kg⁻¹ of each SA; volume of supramolecular solvent = 1.0 mL; vibration motion = 2500 rpm, and centrifugation rate = 15000 rpm; n = 3

^bCentrifugation time = 10 min

^cExtraction time = 30 min

Figure 2 shows the profiles of the kinetic curves obtained for the reaction of derivatization of the different SAs investigated. They were similar to those previously reported in hydro-organic solutions [13]. Maximal signals were obtained at reactions times between 50 and 100 min. In practice, it is convenient to match the time for derivatization and chromatographic run in order to automate the first one in the autosampler [15], so a reaction time of 70 min was selected.

No influence of the matrix components extracted from the meat samples on the yield of the reaction of derivatization was observed. Signals obtained for SA-fortified pure and sample SUPRAS extracts were similar (Figure 3).

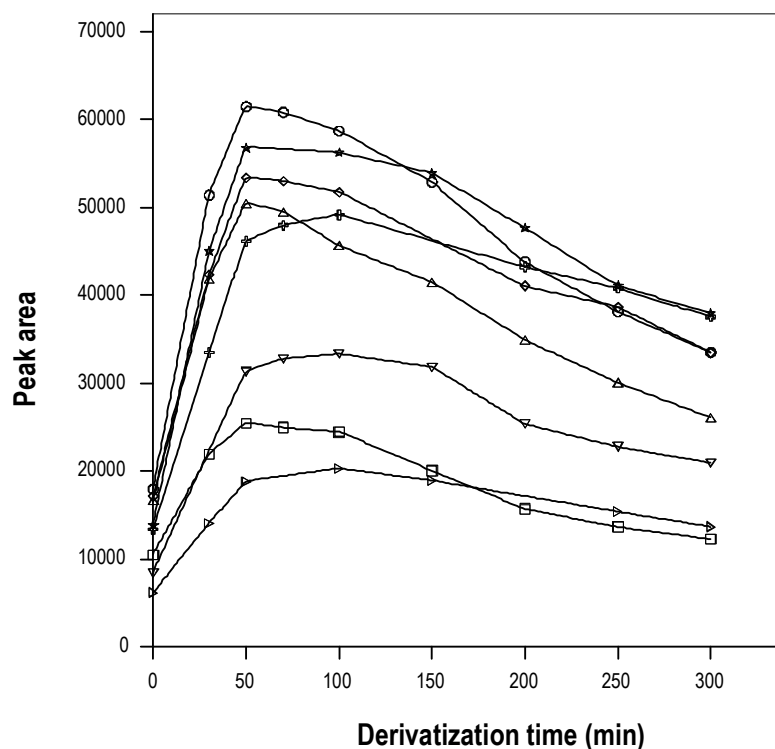


Figure 2. Peak areas measured for SAs (○ SD; △ SM; □ SMP; ▽ SCP; ◇ SDX; ☆ SMT; ⊕ SDM; ▷ SQM) as a function of the derivatization time. [SAs] = 300 µg L⁻¹; [fluorescamine] = 1.5% (w/v); room temperature.

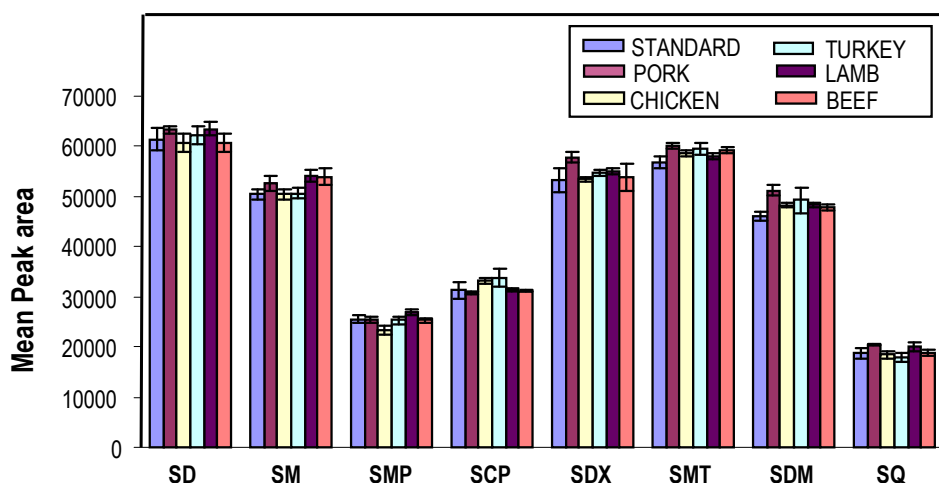


Figure 3. Effect of matrix components from different meat samples on the yield of SAs derivatization products. [SAs] = 300 $\mu\text{g L}^{-1}$; [fluorescamine] = 1.5% (w/v); reaction time = 70 min; room temperature.

3.3. Validation

Validation of the proposed method was carried out according to the guidelines established by the 2002/657/EC Commission Decision [53]. This Decision provides rules for the analytical methods to be used for determining veterinary drug residues in products of animal origin.

3.3.1 Sensitivity and linearity

Calibration parameters and detection (MDLs) and quantitation (MQLs) limits for the determination of SAs by the proposed method are shown in Table 4. Calibration curves were run using six standard solutions prepared in the supramolecular solvent. The linear range was confirmed by the visual inspection of the plot residuals versus analyte amount [57]; the residuals were randomly scattered within a horizontal band and a random sequence of positive and negative residuals was obtained. The MDLs were calculated from six independent complete analysis (experimental procedure in Section 2.4) of pork, chicken, turkey, lamb and beef samples, containing no detectable levels of SAs, by using a signal-to-noise ratio of 3 (the ratio between the peak areas for each target analyte and peak area of noise). The MQLs were calculated in a similar way by using a signal-to-noise ratio of 10. Very small differences were observed between the MDLs and

MQLs achieved for the determination of a given SAs in the different meat matrices assayed and MQLs lower than $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$ (the current MRL established for total SAs in meat [7-9]) were obtained for all the analytes determined. Therefore, taking into account that mixtures of various SAs are rarely used in the veterinary practice, the proposed method is suitable in terms of sensitivity to be used for the monitoring of SAs in meat.

3.3.2. Selectivity

To assess the possible interference from matrix components, two approaches were implemented. The first one consisted in analysing six blank muscle samples from pork, chicken, turkey, lamb and beef, and checking the chromatograms obtained for any peaks in the regions of interest where the target analytes were expected to elute. The second approach involved the comparison of the slopes of the calibration curves obtained from standards in supramolecular solvent with those run from meat fortified with known amounts of the target analytes ($50\text{-}2300 \mu\text{g Kg}^{-1}$) analyzed using the whole recommended procedure (see Section 2.4). Chromatograms obtained from most blank samples analysed showed a peak near the retention time of SD but it did not affect to the accuracy achieved for the determination of the analyte as it could be inferred from the results obtained from the analysis of spiked samples. The slopes of the calibration curves obtained for SD ($n=6$) from pork, chicken, turkey, lamb and beef samples were $6.83\pm 0.03 \text{ pg}^{-1}$, $7.03\pm 0.27 \text{ pg}^{-1}$, $6.76\pm 0.04 \text{ pg}^{-1}$, $6.92\pm 0.05 \text{ pg}^{-1}$, $7.06\pm 0.04 \text{ pg}^{-1}$, $6.75\pm 0.09 \text{ pg}^{-1}$ and that obtained for this analyte from standards in supramolecular solvent $6.83\pm 0.03 \text{ pg}^{-1}$. No statistically significant differences between these slopes were observed by applying a Student t test [58]. The experimental t-values were in the interval 0.01-0.15 and were far below the critical t-value (3.36, significant level=0.01). Similarly, slopes of the calibration curves obtained for the rest of SAs from standard and from meat samples did not show statistically significant differences (experimental t-values= 0.01-2.01, critical t-value=3.36, significant level =0.01).

3.3.3. Trueness

As no certified reference materials for SAs in meat were available, the trueness of the method was assessed by repetitive analysis ($n=11$) of a blank pork sample spiked with $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$ of each SA. The concentrations found, expressed as mean values ($n=6$) \pm the expanded uncertainty, estimated as $k \cdot s$ [59] (coverage factor $k = 2$ for a significant

Table 4. Analytical figures of merit of the proposed method

Sulfonamide antibiotic	Calibration parameters			r ^b	S _{xy} × 10 ²	MDL ^d (µg Kg ⁻¹)	MQL ^e (µg Kg ⁻¹)
	Linear range ^a (ng)	Slope ± s (pg ⁻¹)	Intercept ± s × 10 ³				
SD	0.08-15	6.83±0.03	0.4±0.2	0.99997	3.7	3.4-4.0	12.4-13.3
SM	0.09-15	5.61±0.06	0.6±0.5	0.9998	8.6	4.5-4.8	15.1-16.2
SMP	0.19-15	2.83±0.01	0.5±0.1	0.99997	1.5	9.0-9.7	29.9-32.1
SCP	0.15-15	3.48±0.05	0.1±0.4	0.9995	7.0	7.3-7.8	24.3-26.1
SDX	0.09-15	5.93±0.06	-0.1±0.4	0.9998	7.4	4.3-4.6	14.3-15.3
SMT	0.08-15	6.31±0.07	-0.1±0.6	0.9998	9.3	4.0-4.3	13.4-14.4
SDM	0.10-15	5.13±0.05	0.7±0.4	0.9998	6.4	4.9-5.3	16.5-17.7
SQ	0.25-15	2.09±0.02	0.5±0.2	0.9998	2.9	12.1-13.1	40.5-43.5

^aInstrumental quantitation limit calculated by using a signal-to-noise ratio of 10

^bCorrelation coefficient

^cStandard error of the estimate

^{d,e}Ranges of ^ddetection and ^equantitation limits obtained for the determination of SAs in muscle of pork, chicken, turkey, lamb and beef

level of 0.05), were 100 ± 7 , 102 ± 6 , 102 ± 8 , 100 ± 5 , 100 ± 5 , 100 ± 6 , 101 ± 6 and 101 ± 6 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ SD, SM, SMP, SCP, SDX, SMT, SDM and SQ, respectively. Recoveries ranged between 100 and 102% (according to the 2002/657/EC Commission Decision [53] recovery data are acceptable when they are within the interval 80-110% for analyte concentrations higher than $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$).

3.3.4. Precision

The precision was evaluated in terms of repeatability and reproducibility by analysing thirty aliquots of a blank pork sample spiked with $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$ of SAs. Analyses were performed in five days (six aliquots each) using different supramolecular solvents, standard solutions and mobile phases. The within-assay precision, expressed as standard deviation, was calculated as the square root of the average value of the intra-day variances obtained and, the between-assay one as the square root of the mean intra-day variance plus the inter-day variance. The relative standard deviations under repeatability and reproducibility conditions varied within the intervals 1.8-3.6% and 3.3-6.1%, respectively (according to the 2002/657/EC Commission Decision [53] the relative standard deviation under within-laboratory reproducibility conditions should not exceed 15% for analyte concentrations comprised between 100 and $1000 \mu\text{g Kg}^{-1}$).

3.3.5. Stability

The stability of SAs was assessed in both stock solutions and sample extracts. Stock solutions of each SA at a concentration of 100 mg L^{-1} were stable for at least one month as they were stored at -20°C and working solutions containing 1.5 mg L^{-1} of each analyte were stable for 12 h at room temperature. To evaluate the stability of SAs in meat extracts, samples of pork, chicken, turkey, lamb and beef containing no SAs were fortified with the analytes at two concentration levels ($100 \mu\text{g Kg}^{-1}$ and $500 \mu\text{g Kg}^{-1}$) and extracted using the proposed microextraction procedure (Section 2.4.2). Each of the extract obtained was divided in two aliquots. SAs were determined in one aliquot immediately after extraction and the other one was stored at room temperature for 12 hours before analysis. No differences were obtained between the results obtained from both aliquots.

With regard to the stability of SAs in samples, previous reported studies [16, 17] have demonstrated that these drug residues are stable in edible animal tissues (e.g. muscle of chicken, beef, pork, etc.) for several weeks as they were stored at -20°C.

3.3.6. Decision limit and detection capability

The decision limit ($CC\alpha$) means the limit at and above which it can conclude with an error probability of α that a sample is not-compliant. It was established by analyzing 20 blank pork samples fortified with SAs at the permitted limit (i.e. 100 $\mu\text{g Kg}^{-1}$), and it was calculated from the concentration at the permitted limit plus 1.64 times the standard deviation of the blank samples measurements ($\alpha=5\%$). The decision limits obtained for SD, SM, SMP, SCP, SDX, SMT, SDM and SQ were 106, 105, 107, 104, 106, 105, 105 and 105 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, respectively. The detection capability ($CC\beta$) is the smallest content of the substance that may be detected, identified and/or quantified in a sample with an error probability of β . It was calculated as the value of the decision limit plus 1.64 times the standard deviation of the measurements obtained from the analysis of 20 blank salmon samples fortified with 106 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ SD, 105 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ SM, 107 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ SMP, 104 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ SCP, 106 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ SDX, 105 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ SMT, 105 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ SDM and 105 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ SQ ($\beta=5\%$). The obtained $CC\beta$ values were 111, 110, 113, 109, 111, 110, 109 and 110 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, respectively.

3.4. Analysis of meat samples

The developed method was used to determine SAs in non-fortified and fortified muscle samples of pork, chicken, turkey, lamb and beef, bought in local supermarkets in Córdoba (Spain). The spiking of samples was performed at two concentration levels, i.e. 100 and 500 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, and experiments were made in triplicate. No SAs were detected in the non-spiked samples tested. The mean concentrations found and the recoveries obtained from the analysis of fortified samples are listed in Table 5. The recoveries ranged from 99 to 109% with relative standard deviations from 1 to 5%.

Figure 4 compares the chromatogram obtained from a standard solution containing 70 $\mu\text{g L}^{-1}$ of SAs (A) with those obtained from the analysis of a lamb (B) and chicken (C) sample fortified with 500 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ of SAs. Identification of SAs was based on their retention times. Differences between the retention times measured for the analytes

from standards and fortified samples were lower than 0.5% in all the cases, and the repeatability obtained for consecutive measurements of this parameter from samples, expressed as relative standard deviations (n=6) were 0.34%, 0.28%, 0.35%, 0.19%, 0.15%, 0.19%, 0.12% and 0.10% for SD, SM, SMP, SCP, SDX, SMT, SDM and SQ, respectively. The identification of the target analytes in meat samples containing SAs at detectable concentration levels should be performed by co-chromatography [53] comparing the retention time and the peak width at half-maximum height obtained for each analyte from non-spiked and spiked samples.

4. Conclusions

Based on the use of a supramolecular solvent made up of reverse micelles of DeA, a microextraction was developed for the fast and reliable extraction of SAs from a variety of edible animal tissues. In contrast with previously reported extraction methods [4-6, 13-15, 17, 18], recoveries obtained were quantitative and independent of the matrix composition and no clean-up or concentration steps were needed. The volume of organic solvent used for sample handling was drastically reduced (0.5 mL per sample) and, because of the simplicity of the microextraction, several samples could be simultaneously treated. These characteristics, combined with LC-FL determination, make the proposed method a valuable alternative to those based on the use of organic solvents for the routine monitoring of SA residues in meat.

Because of the ability of SUPRASs to extract analytes in a wide polarity range and the high extraction efficiency they provide, these solvents have a great potential for developing generic sample handling approaches for the determination of organic contaminants in foods.

Table 5. Mean concentration and recoveries, along with their respective standard deviations, obtained from the determination of sulfonamide antibiotics (SAs) in fortified meat samples (Part 1)

Sulfonamide antibiotic	Pork		Chicken		Turkey	
	Concentration found ^{a±s} ^b (µg Kg ⁻¹)	Recovery ±s ^b (%)	Concentration found ^{a±s} ^b (µg Kg ⁻¹)	Recovery ±s ^b (%)	Concentration found ^{a±s} ^b (µg Kg ⁻¹)	Recovery ±s ^b (%)
SD	101±1 ^c	101±1	100±3 ^c	100±3	99±3 ^c	99±3
	502±27 ^d	100±5	499±2 ^d	100±1	501±3 ^d	100±1
SM	102±1 ^c	102±1	104±2 ^c	104±2	101±2 ^c	101±2
	529±21 ^d	106±4	503±5 ^d	100±1	496±4 ^d	99±1
SMP	102±2 ^c	102±2	104±4 ^c	104±4	107±3 ^c	107±3
	495±6 ^d	99±1	488±6 ^d	98±2	492±14 ^d	98±3
SCP	102±1 ^c	102±1	103±2 ^c	103±2	107±5 ^c	107±5
	513±13 ^d	103±3	545±16 ^d	109±3	540±2 ^d	107±3
SDX	102±2 ^c	102±2	101±1 ^c	101±1	101±1 ^c	101±1
	499±11 ^d	100±2	522±7 ^d	104±2	511±2 ^d	102±1
SMT	100±1 ^c	100±1	104±1 ^c	104±1	103±2 ^c	103±2
	515±4 ^d	103±1	529±9 ^d	106±2	526±3 ^d	105±2
SDM	101±1 ^c	101±1	101±1 ^c	101±1	106±5 ^c	106±5
	512±3 ^d	102±1	539±2 ^d	107±4	533±22 ^d	106±4
SQ	102±1 ^c	102±1	101±4 ^c	101±4	102±5 ^c	102±5
	499±11 ^d	100±2	505±6 ^d	101±1	501±6 ^d	100±1

^aMean of three independent determinations; ^bStandard deviation; ^cSample spiked with 100 µg Kg⁻¹; ^dSample spiked with 500 µg Kg⁻¹

Table 5. Mean concentration and recoveries, along with their respective standard deviations, obtained from the determination of sulfonamide antibiotics (SAs) in fortified meat samples (Part 2)

Sulfonamide antibiotic	Lamb		Beef	
	Concentration found ^{a±s} ^b (µg Kg ⁻¹)	Recovery ±s ^b (%)	Concentration found ^{a±s} ^b (µg Kg ⁻¹)	Recovery ±s ^b (%)
SD	99±2 ^c	99±2	102±3 ^c	102±3
	500±3 ^d	100±1	496±7 ^d	99±1
SM	102±2 ^c	102±2	102±3 ^c	102±3
	499±6 ^d	100±1	506±6 ^d	101±1
SMP	102±2 ^c	102±2	104±2 ^c	104±2
	502±2 ^d	100±1	497±13 ^d	99±3
SCP	100±1 ^c	100±1	103±4 ^c	103±4
	498±5 ^d	100±1	503±3 ^d	101±1
SDX	101±1 ^c	101±1	103±5 ^c	103±5
	504±1 ^d	101±1	501±2 ^d	100±1
SMT	103±1 ^c	103±1	104±1 ^c	104±1
	495±1 ^d	99±1	502±4 ^d	100±1
SDM	104±3 ^c	104±3	101±1 ^c	101±1
	509±2 ^d	102±1	511±4 ^d	102±1
SQ	104±4 ^c	104±4	103±3 ^c	103±3
	498±8 ^d	100±2	500±3 ^d	100±1

^aMean of three independent determinations; ^bStandard deviation; ^cSample spiked with 100 µg Kg⁻¹; ^dSample spiked with 500 µg Kg⁻¹

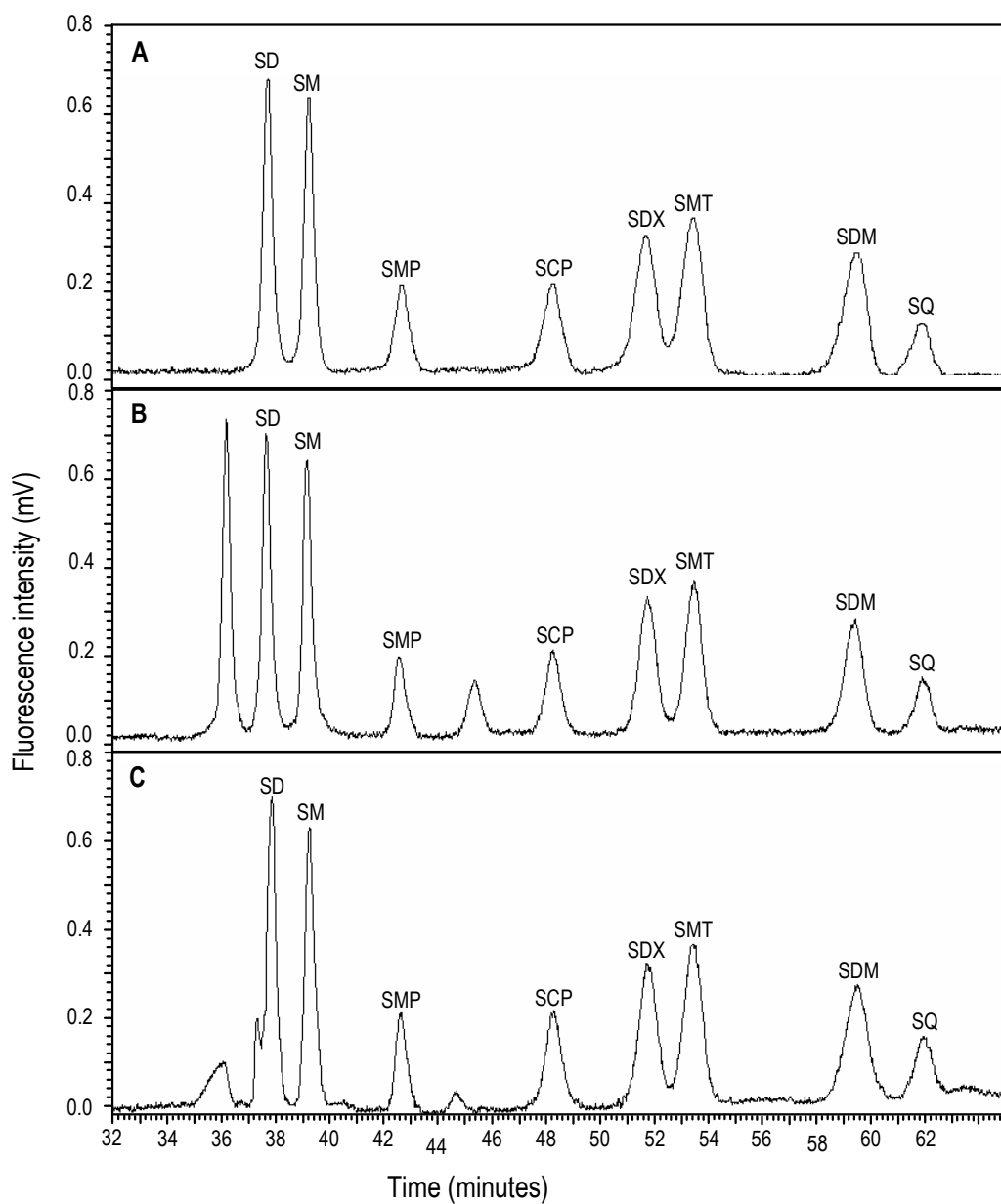


Figure 4. Chromatograms obtained from (A) a standard solution containing $70 \mu\text{g L}^{-1}$ of SAs, and (B,C) 300 mg of meat (B: lamb, C: chicken) sample spiked with $500 \mu\text{g Kg}^{-1}$ of SAs. Chromatographic conditions as specified in Section 2.4.4.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge financial support from Spanish MICINN (Project CTQ2008-01068). E. M. Costi acknowledges the Andalusian CICYE for a postgraduate fellowship.

References

- [1] A. Gentilí, D. Perret, S. Marchese, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005), 704.
- [2] T. Li, Z-G. Shi, M-M. Zheng, Y-Q. Feng, *J. Chromatogr. A* 1205 (2008) 163.
- [3] M.S. Díaz-Cruz, M.J. López de Alda, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 340.
- [4] Z. Cai, Y. Zhang, H. Pan, X. Tie, Y. Ren, *J. Chromatogr. A* 1200 (2008) 144.
- [5] W. Hela, M. Brandtner, R. Widek, R. Schuh, *Food Chem.* 83 (2003) 601.
- [6] G. Font, A. Juan-García, Y. Pico, *J. Chromatogr. A* 1159 (2007) 233.
- [7] Council Regulation (EEC) No. 2377/90 of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, *Off. J. Eur. Commun.* L 224, 18.8.1990, p.1.
- [8] Food and Drug Administration. New animal drug for use in animal feed; Code of Federal Regulations, FDA, Washington, DC, 1988 (Title 21, Part 558).
- [9] Establishment of maximum residue levels of veterinary medical products in foodstuffs of animal origin, The Ministry of Agriculture, PR China, Regulation No 235, 2002.
- [10] B. Shao, D. Dong, Y. Wu, J. Hu, J. Meng, X. Tu, S. Xu, *Anal. Chin. Acta* 546 (2005) 174.
- [11] W.M.A. Niessen, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 53.
- [12] D.G. Kennedy, R.J. McCracken, A. Cannavan, S.A. Hewitt, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 77.
- [13] N. Takeda, Y. Akiyama, *J. Chromatogr.* 558 (1991) 175.
- [14] G. Stoev, A. Michailova, *J. Chromatogr. A* 871 (2000) 37.
- [15] C.D.C. Salisbury, J.C. Sweet, R. Munro, *J. AOAC Int.* 87 (2004) 1264.
- [16] A. Posyniak, J. Zmudzki, K. Mitrowska, *J. Chromatogr. A* 1087 (2005) 259.
- [17] I. Pecorelli, R. Bibi, L. Fioroni, R. Galarini, *J. Chromatogr. A* 1032 (2004) 23-29.
- [18] M. Gratacós-Cubarsí, M. Castellari, A. Valero, *Anal. Bional. Chem.* 385 (2006) 1218.

- [19] T. Li, Z.-G. Shi, M.-M. Zheng, Y.-Q. Feng, *J. Chromatogr. A* 1205 (2008) 163.
- [20] M.H. Akhtar, M. Wong, S.R.H. Crooks, A. Sauve, *Food Addit. Contam.* 15 (1998) 542.
- [21] V. Arancibia, M. Valderrama, P. Rodríguez, F. Hurtado, R. Segura, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 1710.
- [22] K. Kishida, N. Furusawa, *J. Chromatogr. A* 937 (2001) 49.
- [23] W.-H. Tasai, T.-C. Huang, H.-H. Chen, Y.-W. Wu, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 250.
- [24] A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 530.
- [25] W.L. Hinze, *Ann. Chim. (Rome)* 77 (1987) 167.
- [26] E. Pramauro, E. Pelizzetti, *Surfactants in Analytical Chemistry. Applications of Organized Amphiphilic Media*, Elsevier, New York, USA, 1996.
- [27] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, C. García-Pinto, E. Fernández Laespada, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 251.
- [28] I. Casero, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4519.
- [29] M. Cantero, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1046 (2004) 147.
- [30] A. Ballesteros-Gómez, M.D. Sicilia, S. Rubio, *Anal. Chim. Acta* (2010) in press.
- [31] S. Xie, M.C. Paa, C.F. Li, D. Xiao, M.M.F. Choi, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2306.
- [32] Z. Sosa, C. Padron, C. Mahugo, J.J. Santana, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 469.
- [33] E.K. Paleologos, D.L. Giokas, M.I. Karayannis, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 426.
- [34] F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 78 (2006) 7229.
- [35] F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7473.
- [36] G. Jia, C. Bi, Q. Wang, J. Qiu, W. Zhou, Z. Zhou, *Anal. Bional. Chem.* 384 (2006) 1423.
- [37] A. Moral, M.D. Sicilia, S. Rubio, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 3740.
- [38] F. J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 109.
- [39] F.J. López-Jiménez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Food Chem.* 121 (2010) 763.
- [40] A. García-Prieto, L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 630 (2008) 19.
- [41] F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1163 (2007) 269.
- [42] F.J. López-Jiménez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1195 (2008) 25.

-
- [43] S. Santalad, R. Srijaranai, R. Burakham, J.D. Glennon, R.L. Deming, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 1307.
- [44] A. Moral, M.D. Sicilia, S. Rubio, *Anal. Chim. Acta* 650 (2009) 207.
- [45] J. Chen, W.. Zhao, W. Liu, Z.. Zhou, M.. Yang, *Food Chem.* 115 (2009) 189.
- [46] Z. Zhou, J. Chen, D. Zhao, M. Yang, *J. Agric. Food Chem* 57 (2009) 8722.
- [47] A. García-Prieto, L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 617 (2008) 51.
- [48] A. García-Prieto, L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Food Addit. Contam.* 26 (2009) 265.
- [49] E.M. Costi, M.D. Sicilia, S. Rubio, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1447.
- [50] L. Chen, Q. Zhao, H. Jin, X. Zhang, Y. Xu, A. Yu, H. Zhang, L. Ding, *Talanta* 81 (2010) 692.
- [51] C. Kukusamude, A. Santalada, S. Boonchiangma, R. Burakham, S. Srijaranai, O. Chailapakul, *Talanta* 81 (2010) 486.
- [52] S. García-Fonseca, A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 617 (2008) 3.
- [53] Commission Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.
- [54] Nutrition Facts Database (version 0.9.3.5, 2008).
- [55] J. N. Miller, J. C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Fifth Edition, Pearson Education, Harlow, 2005, pp. 49.
- [56] S. de Bernardo, M. Weigele, V. Toome, K. Manhart, W. Leimgruber, P. Böhlen, S. Stein, S. Udenfriend, *Arch. Biochem. Biophys.* 163 (1974) 390.
- [57] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. de Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A. Data Handling in Science and Technology Series*, Vol. 20A. Elsevier, Amsterdam, 1997, pp. 179.
- [58] L. Cuadros, A. M. García, F. Alés, C. Jiménez, M. Román, *J. AOAC Int.* 78 (1995) 471.
- [59] ISO/IEC Guide 98: 1995, Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM).



**Parte III. Hemimicelas/
admicelas**

1. OBJETO

Los adsorbentes supramoleculares constituidos por agregados de tensioactivo adsorbidos sobre un soporte sólido, constituyen una herramienta adecuada para la extracción en fase sólida de una gran variedad de analitos. La gran versatilidad de estos adsorbentes es debida fundamentalmente a:

- 1) La posibilidad de seleccionar el adsorbente más adecuado para cada aplicación concreta dentro de un gran abanico de posibilidades. Existe un elevado número de tensioactivos con diferente estructura química disponibles, que pueden dar lugar a adsorbentes supramoleculares con diferente capacidad de adsolubilización en función de las condiciones experimentales en las que se realice la síntesis del adsorbente. Estas condiciones determinan el tipo de agregado formado, hemimicelas o admicelas, y la carga de tensioactivo sobre el soporte sólido.
- 2) La capacidad de los adsorbentes supramoleculares para interaccionar con los analitos a través de diferentes mecanismos: interacciones hidrofóbicas, electrostáticas, π -catión, etc.

La tercera parte de esta Tesis Doctoral ha tenido un doble objetivo:

- 1) Determinar la capacidad de los adsorbentes supramoleculares para la extracción y preconcentración de drogas usadas como principios activos en fármacos en muestras acuosas medioambientales. Se trata de contaminantes emergentes que se encuentran a baja concentración, lo que, junto con la complejidad de las muestras, dificulta notablemente su determinación.
- 2) Establecer el mecanismo a través del cual se produce la adsolubilización de las drogas en el adsorbente supramolecular utilizado para su extracción.

Antes de presentar los resultados obtenidos en las investigaciones realizadas sobre esta temática, se expondrán aspectos básicos sobre los adsorbentes supramoleculares y la adsolubilización de analitos sobre estos adsorbentes, así como una panorámica de las aplicaciones de la extracción en fase sólida supramolecular en el ámbito analítico.

2. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA SUPRAMOLECULAR

2.1. Formación del adsorbente supramolecular

Los adsorbentes supramoleculares pueden estar constituidos por hemimicelas, hemimicelas y admicelas o admicelas. Las hemimicelas y las admicelas son agregados supramoleculares que se forman por adsorción de un tensioactivo iónico sobre la superficie de un soporte sólido de carga opuesta. Los óxidos minerales, alúmina y sílice, son los soportes sólidos más ampliamente utilizados para la obtención de adsorbentes supramoleculares [1]. Otros materiales sólidos usados han sido nanopartículas de magnetita [2-4], magnetita recubierta por óxidos minerales [5, 6], nanotubos de titanato [7] y resinas de intercambio iónico [8,9].

El tipo de agregado formado sobre la superficie del soporte sólido depende de una serie de factores entre los que cabe destacar el sistema tensioactivo-soporte sólido usado, el pH al que se produce la adsorción del tensioactivo sobre el soporte y la relación cantidad de tensioactivo/cantidad de soporte sólido utilizada en la síntesis del adsorbente. Para establecer el tipo o tipos de agregados formados en unas condiciones experimentales dadas, es fundamental conocer la isoterma de adsorción del tensioactivo sobre el soporte en dichas condiciones experimentales. Se pueden diferenciar dos tipos de isotermas en función de la naturaleza de la superficie del soporte sólido usado: isotermas de carga constante, obtenidas cuando la adsorción del tensioactivo se produce sin protonación del sólido, e isotermas de potencial constante, en las que el tensioactivo induce la protonación o desprotonación de la superficie del soporte [10]. Las isotermas obtenidas para la adsorción de tensioactivos iónicos sobre alúmina y sílice son isotermas de potencial constante.

En la Figura 1 se muestra una isoterma de adsorción de potencial constante típica y en la Figura 2, las estructuras de los agregados de tensioactivo formados en las distintas regiones que se pueden observar en la isoterma. La región correspondiente a concentraciones de tensioactivo inferiores a la concentración hemimicelar crítica (CHC) se denomina región de Henry. En esta región, los grupos cabeza de los monómeros de tensioactivo interactúan electrostáticamente con la superficie del óxido mineral, sin que se produzca ningún tipo de interacción entre los monómeros adsorbidos. A concentraciones de tensioactivo superiores a su CHC, región hemimicelar, además de interacciones electrostáticas del tensioactivo con la superficie del óxido, se producen

interacciones hidrofóbicas entre sus cadenas hidrocarbonadas, formándose una monocapa constituida por estructuras de agregación típicas, denominadas tipi. Cuando toda la superficie del óxido está neutralizada y la densidad de hemimicelas es máxima, comienzan a formarse admicelas, agregados con una estructura similar a la de las micelas. En esta región, la adsorción del tensioactivo se produce exclusivamente mediante interacciones hidrófobas entre las cadenas hidrocarbonadas del tensioactivo. Una vez alcanzada la carga máxima del tensioactivo, toda la superficie del óxido está cubierta por admicelas, y la adición de más tensioactivo produce un incremento de su concentración en disolución, hasta alcanzar la concentración micelar crítica (CMC), a partir de la cual se forman micelas en disolución.

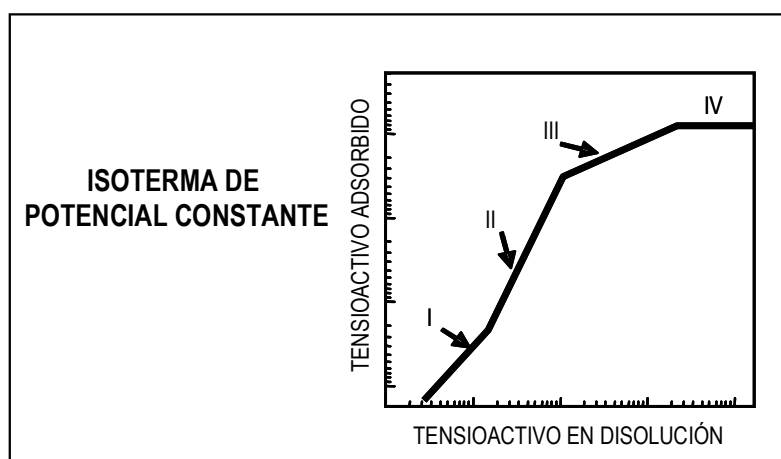


Figura 1. Isoterma de adsorción de potencial constante

El pH es una de las variables que más influye en la isoterma de adsorción obtenida. Esta variable determina la densidad de carga de la superficie del soporte sólido y, por lo tanto, la cantidad total de tensioactivo adsorbido en la región hemimicelar, lo que, a su vez, determina la cantidad máxima de tensioactivo que puede adsorberse en la región admicelar. El pH también afecta a la concentración de tensioactivo a la que se forman hemimicelas y admicelas [11]. La densidad de carga superficial positiva aumenta a medida que disminuye el pH por debajo del punto de carga cero (pcz) de los óxidos minerales y la densidad de carga superficial negativa aumenta a medida que aumenta el pH por encima de su pcz. La alúmina (pcz=8,5) generalmente se utiliza para la formación de adsorbentes supramoleculares de tensioactivos aniónicos a valores de pH ácidos [11] y la sílice (pcz=3) para la formación de adsorbentes supramoleculares de tensioactivos catiónicos a valores de pH cercanos a la neutralidad [12]. En estas condiciones, la

densidad de carga sobre los óxidos es máxima, favoreciéndose la adsorción de una elevada cantidad de tensioactivo.

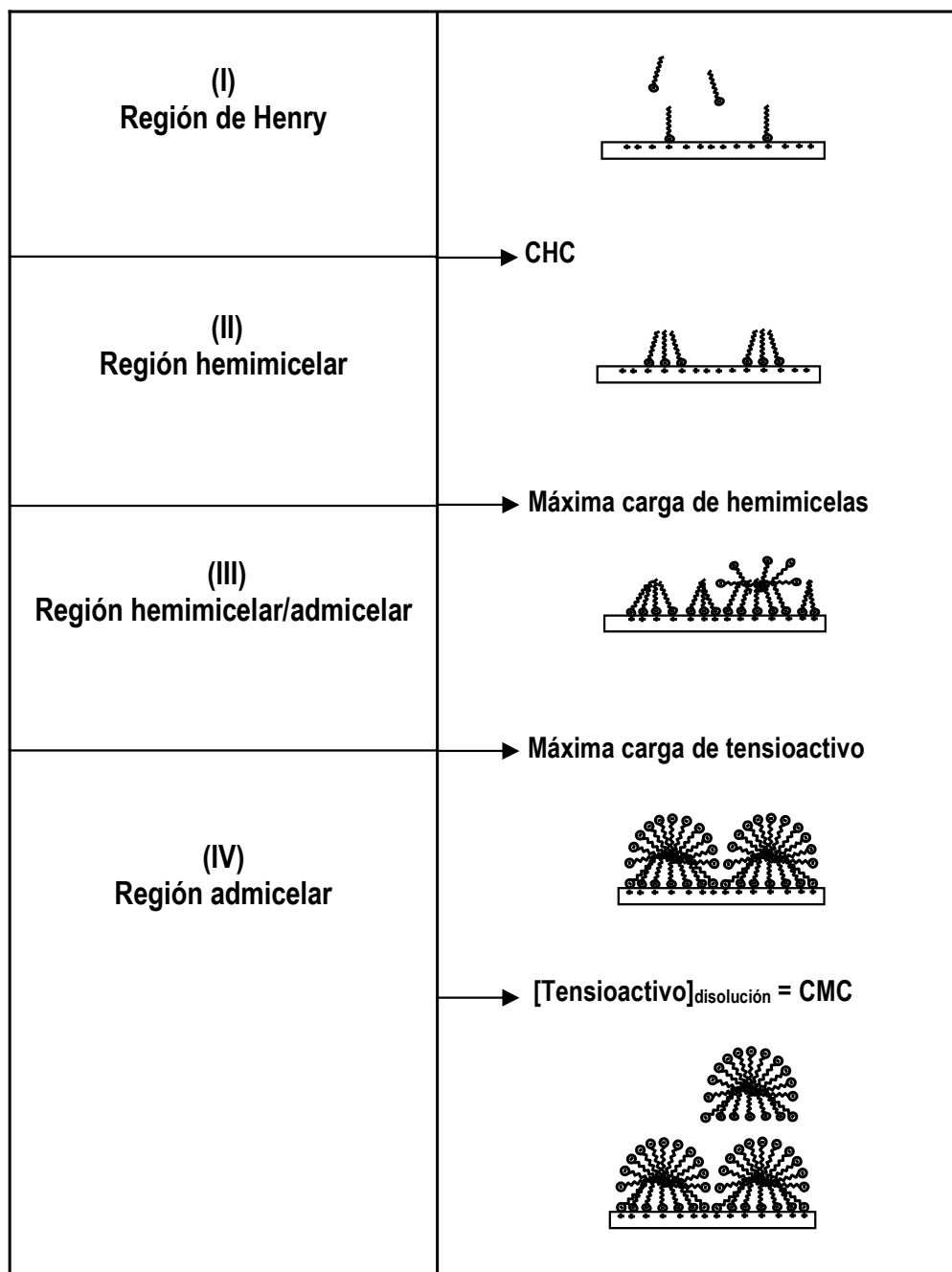


Figura 2. Estructuras de los agregados formados en las diferentes regiones de la isoterma de adsorción.

Variables que influyen en la formación de micelas como la estructura molecular del tensioactivo, la concentración de sales y la temperatura, también afectan a la formación de hemimicelas y admicelas [13]. Cuanto mayor es la longitud de la cadena hidrocarbonada del tensioactivo, más fuertes son las interacciones hidrófobas que se producen entre sus monómeros, favoreciéndose la formación de los agregados a menores concentraciones de tensioactivo. De acuerdo con la regla de Traube [14], un incremento de un átomo de carbono en la longitud de la cadena hidrocarbonada del tensioactivo reduce la CMC y la CHC a la tercera parte.

La presencia de electrolito desfavorece la formación de hemimicelas al disminuir las interacciones electrostáticas atractivas tensioactivo-óxido mineral y favorece la formación de admicelas al disminuir las interacciones electrostáticas repulsivas que se producen entre los grupos cargados de las moléculas de tensioactivo en estos agregados [15]. Finalmente, la temperatura disminuye la cantidad máxima de tensioactivo que puede adsorberse sobre el óxido mineral. Un aumento de la temperatura origina un aumento de la energía cinética de los monómeros de tensioactivo y por lo tanto, un aumento de la entropía del sistema, produciéndose una disminución de la organización de los agregados en la superficie del adsorbente [16].

2.2. Proceso de adsolubilización

Los adsorbentes supramoleculares tienen la capacidad de solubilizar solutos mediante un proceso denominado adsolubilización, propiedad con un gran potencial para su uso con fines analíticos en esquemas de extracción en fase sólida. La adsolubilización de compuestos orgánicos se puede producir mediante diferentes mecanismos de interacción tensioactivo-analito dependiendo del tipo de adsorbente supramolecular usado (hemimicelas, hemimicelas/admicelas o admicelas), de la estructura molecular del tensioactivo utilizado para formar el adsorbente y de la estructura molecular del propio analito.

La adsorción de compuestos orgánicos sobre hemimicelas se produce exclusivamente mediante interacciones hidrófobas con las cadenas hidrocarbonadas de las moléculas de tensioactivo. Sin embargo, cuando se usan mezclas de hemimicelas y admicelas o admicelas como adsorbente supramolecular, el número de interacciones de diferente naturaleza que se pueden producir se amplía de forma considerable. Además de interacciones hidrófobas, se pueden producir interacciones iónicas con los grupos

cabeza cargados de las moléculas de tensioactivo en contacto con la disolución, formación de puentes de hidrógeno cuando se utilizan tensioactivos con grupos aceptores o donadores de protones (por ej. alquilcarboxilatos) e interacciones π -catión, usando tensioactivos catiónicos para retener analitos con anillos aromáticos en su estructura molecular.

De especial interés por su elevada eficacia, es la adsolubilización de compuestos anfífilos mediante la formación de hemimicelas/admicelas mixtas. Los estudios llevados a cabo hasta la realización de esta Tesis Doctoral, se han centrado en la adsolubilización de tensioactivos sobre adsorbentes supramoleculares de diferente naturaleza. A continuación comentaremos los principales resultados publicados sobre esta temática.

2.3. Adsolubilización de tensioactivos mediante la formación de hemimicelas/admicelas mixtas

Diferentes estudios han demostrado la capacidad de los tensioactivos iónicos para inducir la adsorción de monómeros de otros tensioactivos sobre superficies sólidas mediante la formación de agregados mixtos [12, 17-20]. Este efecto se ha descrito para la adsolubilización de tensioactivos no iónicos, catiónicos y aniónicos.

Los tensioactivos no iónicos no se adsorben o presentan una adsorción muy baja sobre óxidos minerales. Sin embargo, en presencia de tensioactivos iónicos se produce un importante aumento de la cantidad de tensioactivo no iónico adsorbido sobre superficies sólidas. En la Figura 3 se muestran las isotermas de adsorción sobre alúmina del tensioactivo no iónico dodeciloxiheptaetoxietilalcohol ($C_{12}EO_8$) y del tensioactivo aniónico octilbencenosulfonato sódico (SOBS) puros y de SOBS y $C_{12}EO_8$ en mezcla con concentraciones de ambos tensioactivos en una relación molar 1:1 [17]. Lógicamente, la máxima cantidad de tensioactivo no iónico puro adsorbida sobre alúmina es muy inferior a la cantidad de tensioactivo aniónico puro adsorbida sobre este óxido en las mismas condiciones (comparar las isotermas a y b en la Figura 3). En disoluciones que contienen SOBS y $C_{12}EO_8$ se produce un efecto sinérgico, favoreciéndose la adsorción de ambos tensioactivos. La cantidad máxima de tensioactivo no iónico adsorbida en presencia de tensioactivo aniónico aumenta aproximadamente tres órdenes de magnitud con respecto a la adsorbida en su ausencia (comparar las isotermas a y d en la Figura 3) y la formación de agregados mixtos adsorbidos SOBS- $C_{12}EO_8$ comienza a una concentración

de tensioactivo aniónico inferior a la necesaria para la formación de agregados simples de SOBS (comparar la isoterma a y c en la Figura 3). El tensioactivo aniónico forma centros de nucleación hidrofóbicos sobre la superficie de la alúmina en los que se incorpora el tensioactivo no iónico, y el tensioactivo no iónico reduce las interacciones electrostáticas repulsivas entre los grupos cargados del tensioactivo aniónico favoreciendo la agregación.

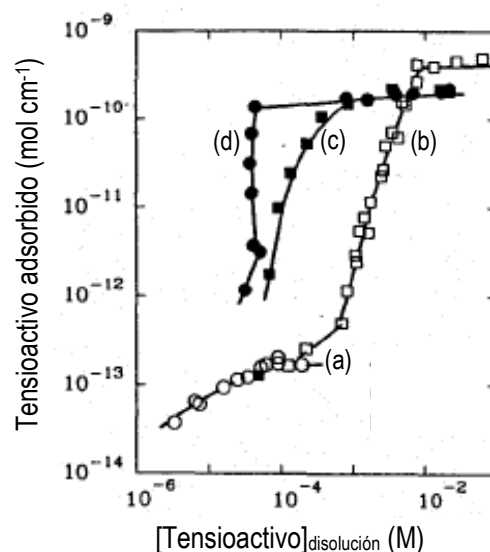


Figura 3. Isotermas de adsorción sobre alúmina de los tensioactivos (a, d) dodeciloheptaetoxietilalcohol ($C_{12}EO_8$) y (b, c) octilbencenosulfonato sódico (SOBS) para (a, b) los tensioactivos puros y (c, d) mezclas de ambos tensioactivos con concentraciones en una relación molar 1:1.

La eficacia de adsolubilización de los tensioactivos mediante formación de hemimicelas/admicelas mixtas depende de la naturaleza y estructura química de los tensioactivos que forman dichos agregados mixtos. La eficacia de la adsolubilización de tensioactivos no iónicos es mayor en presencia de tensioactivos aniónicos que catiónicos [18] y la de tensioactivos iónicos, aumenta cuando ambos tensioactivos tienen carga opuesta con respecto a la obtenida para tensioactivos con la misma carga [19]. En la Figura 4 se muestra la variación del porcentaje de diferentes tensioactivos aniónicos perfluorados (PFCs) adsolubilizados en función de la cantidad de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (Fig. 4A) y de SDS (Fig. 4B) usados por gramo de sílice y alúmina, respectivamente. El adsorbente SDS-alúmina proporciona porcentajes de

adsolubilización inferiores a los obtenidos con el adsorbente CTAB-sílice para los PFCs menos hidrófobos [ácido heptafluorobutírico (HFBA) y ácido perfluoroheptánico (PFHeA)].

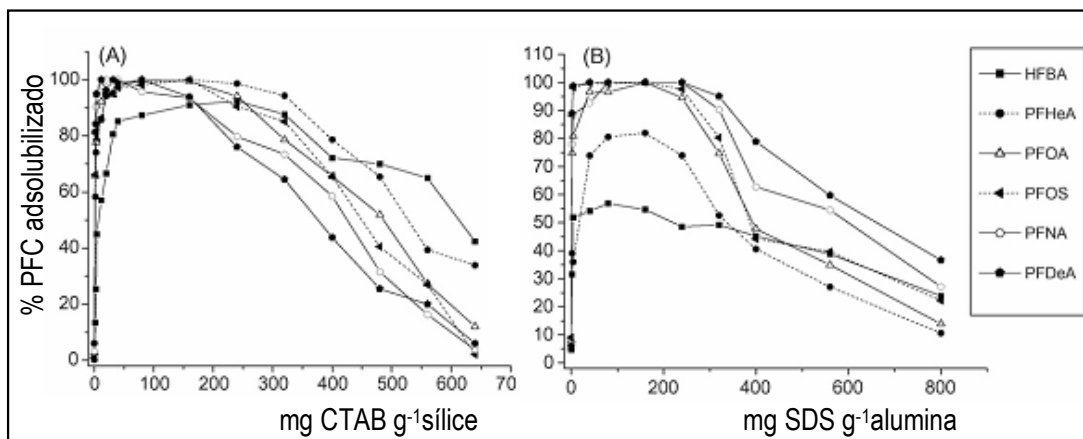


Figura 4. Efecto de la cantidad de (A) CTAB y (B) SDS en la adsolubilización de tensioactivos perfluorados (PFCs). HFBA: ácido heptafluorobutírico, PFHeA: ácido perfluoroheptánico, PFOA: ácido perfluorooctánico, PFOS: ácido perfluorooctánico sulfónico; PFNA: ácido perfluorononánico; PFDeA: ácido perfluorodecanóico.

Finalmente, la eficacia de la adsolubilización también depende de la fuerza de las interacciones hidrofóbicas que se producen entre las cadenas hidrocarbonadas de los tensioactivos que forman los agregados mixtos. La eficacia de la adsolubilización aumenta a medida que aumenta la hidrofobicidad de dichos tensioactivos [12, 19- 21].

2.4. Procedimiento operacional para la extracción en fase sólida supramolecular

En la Figura 5 se esquematiza el procedimiento a seguir para la extracción en fase sólida supramolecular de analitos en muestras acuosas. Este procedimiento conlleva tres etapas:

- 1) *Formación del adsorbente supramolecular.* La disolución de tensioactivo con un pH igual al que se usará para realizar la extracción de los analitos, se pasa a través del soporte sólido empaquetado en un cartucho de extracción.
- 2) *Adsolubilización de los analitos.* El pH de la muestra se ajusta al valor adecuado y, en el caso de realizar la extracción en una región de la isoterma

de adsorción en la que la concentración de tensioactivo en la disolución en equilibrio con el adsorbente supramolecular sea apreciable (regiones hemimicelar/admicelar y admicelar), se adiciona dicha concentración de tensioactivo a la muestra, con el fin de evitar que se produzca una disminución de la carga de tensioactivo sobre el soporte sólido durante la percolación de dicha muestra a través del adsorbente supramolecular. La muestra se hace pasar a través del adsorbente a una velocidad de percolación adecuada para asegurar una adsolubilización eficaz de los analitos.

- 3) *Elución de los analitos.* Los analitos se eluyen con un pequeño volumen (1-2 mL) de disolvente orgánico o de disolución acuosa a un valor de pH adecuado para la desorción del tensioactivo.

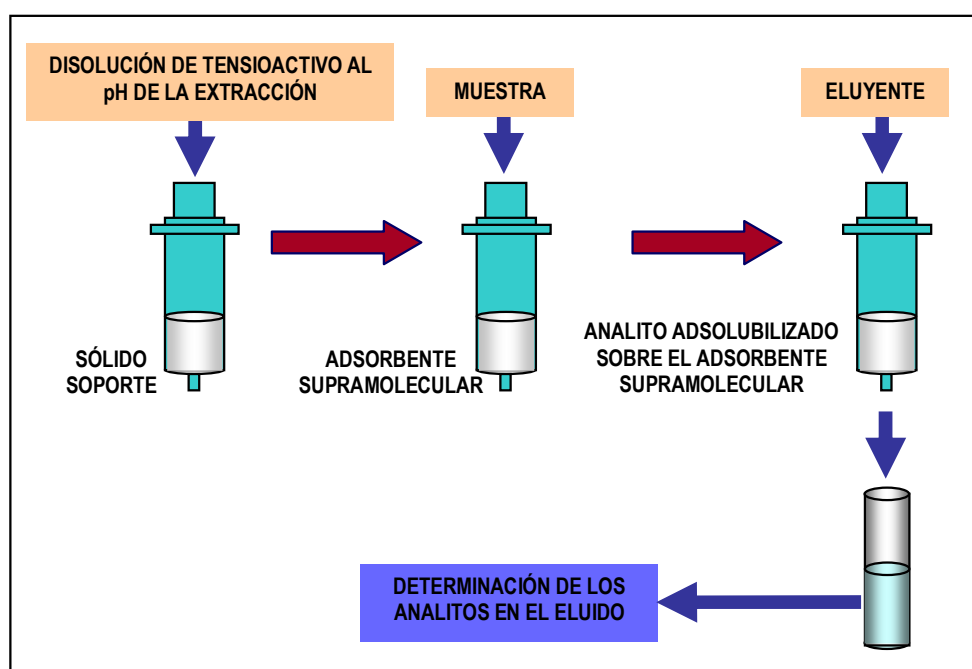


Figura 5. Procedimiento operativo para la extracción de analitos en muestras acuosas con el uso de adsorbentes supramoleculares.

2.5. Aplicaciones analíticas de la extracción en fase sólida supramolecular

Dada la capacidad de los adsorbentes supramoleculares para adsolubilizar analitos mediante diferentes tipos de interacciones y los elevados factores de

preconcentración que proporcionan, estos adsorbentes constituyen una excelente herramienta para la extracción de compuestos de muy diferente naturaleza a baja concentración en muestras acuosas medioambientales. Inicialmente, la extracción en fase sólida supramolecular se utilizó para la extracción de metales pesados basada en la formación de complejos, usando ligandos previamente adsolubilizados sobre el adsorbente [22-24] o adsolubilizando los complejos formados en la disolución acuosa [23, 25]. Más recientemente, su uso se ha extendido a la extracción/preconcentración de compuestos orgánicos [1]. En la Tabla 1 se muestran los diferentes adsorbentes supramoleculares usados para la extracción de compuestos orgánicos en muestras acuosas medioambientales.

Los adsorbentes supramoleculares obtenidos mediante la adsorción de SDS sobre alúmina han sido los más utilizados en extracciones analíticas. En la mayoría de los casos, la adsolubilización se produce mediante interacciones hidrófobas con las hemimicelas de SDS formadas sobre la alúmina [20, 26, 28, 29], aunque también se ha propuesto el uso de hemimicelas/admicelas [30] y admicelas [11]. Las interacciones electrostáticas que se producen con los grupos sulfato en la superficie de las admicelas de SDS favorecen la adsolubilización de compuestos polares catiónicos. La incorporación del catión tetrabutilamonio (Bu_4N^+) al sistema SDS-alúmina para formar agregados mixtos adsorbidos Bu_4N^+ -SDS-alúmina aumenta la capacidad del adsorbente supramolecular para solubilizar analitos polares con anillos aromáticos en su estructura molecular, produciendo interacciones π -catión, además de interacciones hidrofóbicas [31]. Este adsorbente mixto ha sido usado para la extracción simultánea de plaguicidas ácidos, neutros y básicos de diferente polaridad alcanzándose factores de preconcentración que variaron entre 60 y 250 [32].

La capacidad de los adsorbentes supramoleculares para adsolubilizar tensioactivos mediante la formación de agregados mixtos se ha utilizado para desarrollar métodos para la extracción/preconcentración de tensioactivos de diferente naturaleza: no iónicos, aniónicos y catiónicos. Las fuertes interacciones que se establecen entre las moléculas del tensioactivo analito y las del tensioactivo usado para formar el adsorbente supramolecular permiten obtener extracciones cuantitativas de los analitos usando volúmenes de muestra muy elevados (0,5-1 L). Las hemimicelas/admicelas aniónicas proporcionan elevada eficacia para la adsolubilización de tensioactivos no iónicos [20] y catiónicos [8, 21] y las hemimicelas/admicelas catiónicas para la adsolubilización de tensioactivos aniónicos [12, 19]. Dada la elevada eficacia que presentan los adsorbentes

supramoleculares para la extracción/preconcentración de tensioactivos, es de prever que estos adsorbentes también constituyan una herramienta adecuada para la extracción de otros compuestos anfífilos con estructura molecular diferente a la de los tensioactivos.

Muy recientemente se ha propuesto el uso de soportes sólidos magnéticos [2-4] para formar los adsorbentes supramoleculares, lo que permite reducir los tiempos de extracción, al evitar la percolación de la muestra a través de cartuchos empaquetados.

Tabla 1. Aplicaciones de los adsorbentes supramoleculares para la extracción de compuestos orgánicos de muestras acuosas medioambientales

Adsorbente supramolecular	Analitos	Muestras	Referencias
Dodecilsulfato sódico (SDS)-alúmina	Tensioactivos no iónicos y catiónicos	Aguas residuales y de río	[20, 21]
	Alquilfenoles y alquilfenolcarboxilatos	Aguas residuales y de río	[26]
	Clorofenoles	Agua de río	[27]
	Ésteres de ftalato	Aguas residuales	[28]
	Estrógenos	Aguas residuales y de río	[29]
	Fungicidas	Aguas subterráneas y de río	[30]
	Herbicidas	Agua potable y embotellada	[11]
SDS-Bromuro de tetrabutilamonio-alúmina	Bisfenoles	Aguas residuales	[31]
	Multirresiduos de plaguicidas	Agua subterránea y de río	[32]
Aerosol OT-alúmina	Clorofenoles	Agua de río	[33]
Cloruro de cetilpiridinio (CPC)-sílice	Tensioactivos aniónicos	Aguas residuales y de río	[12]
Bromuro de cetiltrimetilamonio(CTAB)-sílice	Tensioactivos perfluorados	Aguas residuales y de río	[19]
Bromuro de dicetildimetilamonio-sílice	PAHs	Agua potable y de río	[34]

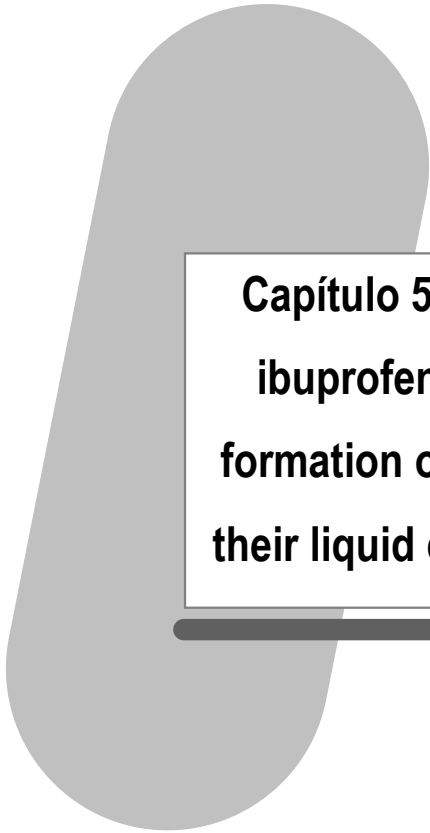
Tabla 1. Continuación

CTAB-magnetita	Fenoles	Agua potable, subterránea, de río y residual	[2, 3]
Ácido tetradecanóico-magnetita	PAHs	Aguas naturales superficiales y subterráneas	[4]
CPC-magnetita recubierta de sílice	Compuestos fenólicos	Agua potable, subterránea, de río y residual	[5]
CTAB-nanotubos de titanato	Ésteres de ftalato	Aguas naturales superficiales y subterráneas	[7]
SDS-resina de intercambio aniónico	Tensioactivos catiónicos	Agua de río	[8]

3. BIBLIOGRAFÍA

- [1] S. Gangula, S. Suen, E. D. Conte, *Microchem. J.* 95 (2010) 2.
- [2] J. Li, X. Zhao, Y. Shi, Y. Cai, S. Mou, G. Jiang, *J. Chromatog. A* 1180(2008) 24.
- [3] X. Zhao, Y. Shi, Y. Cai, S. Mou, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 1201
- [4] A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, *Anal. Chem.* 81 (2009) 9012.
- [5] X. Zhao, Y. Shi, T. Wang, Y. Cai, G. Jiang, *J. Chromatogr. A* 1188 (2008) 140.
- [6] L. Sun, C. Zhang, L. Chen, J. Liu, H. Jin, H. Xu, L. Ding, *Anal. Chim. Acta* 638 (2009) 162.
- [7] H. Niu, Y. Cai, Y. Shi, F. Wei, S. Mou, G. Jiang, *J. Chromatogr. A* 1172 (2007) 113.
- [8] J.K. Autry, E.G. Vaught, E.D. Conte, *Microchem. J.* 80 (2005) 25.
- [9] K.R. Reid, L.J. Kennedy, E. W. Crick, E. D. Conte, *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 135.
- [10] S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 470.
- [11] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 76 (2004) 3878.
- [12] L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Analyst* 131 (2006) 835.
- [13] D. Bitting, J. H. Harwell, *Langmuir* 3 (1987) 531
- [14] A. Fan, P. Somasundaran, N. J. Turro, *Langmuir* 13 (1997) 506.
- [15] A. García-Prieto, L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Bional. Chem* 388 (2007) 1823.
- [16] S. Paria, K. C. Khilar, *Adv. Colloid Interfac.* 110 (2004) 75.
- [17] E. Fu, P. Somasundaran, Q. Xu, en: P. M. Holland, D.N. Rubingh (Ed.), *Mixed Surfactant Systems*. ACS Symposium Series 501. American Chemical Society, Washington, DC, 1992, Cap. 25.
- [18] P. Somasundaran, L. Huang, *Advances in Colloid and Interface Science* 88 (2000) 179.
- [19] X. Zhzo, J. Li, Y. Shi, Y. Cai, S. Mou, G. Jiang, *J. Chromatogr. A* 1154 (2007) 52.
- [20] M. Cantero, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005)161.
- [21] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6799.
- [22] J. L. Manzoori, M. H. Sorouraddin, F. Shemirani, *Talanta* 42 (1995) 1151.
- [23] M. Hirade, J. Iwasawa, H. Tawaguchi, *Talanta* 44 (1997) 231.
- [24] J. L. Manzoori, M. H. Sorouraddin, A. H. M. Shabani, *Microchem. J.* 63 (1999) 295.
- [25] M. Hirade, Hori, *J. Anal. Sci.* 15 (1999) 1055.
- [26] M. Cantero, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1120 (2006) 271.
- [27] T. Saitoh, Y. Nakayama, M. T. Hiraide, D. Bitting, J. H. Harwell, *J. Chromatogr. A* 972 (2002) 205.

-
- [28] F. J. López-Jiménez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 551 (2005) 142.
- [29] A. García-Prieto, L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Analyst* 131 (2006) 407.
- [30] A. Moral, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 569 (2006) 132.
- [31] A. Moral, M. D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1100 (2005) 8.
- [32] A. Moral, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 608 (2008) 61.
- [33] T. Saitoh, S. Matsushima, M. Hiraide, *J. Chromatogr. A* 1040 (2004) 185.
- [34] Q. Zhao, J. Simmons, E. D. Conte, *J. Chromatogr. A* 1132 (2006) 1.



**Capítulo 5. Supramolecular solid-phase extraction of
ibuprofen and naproxen from sewage based on the
formation of mixed supramolecular aggregates prior to
their liquid chromatographic/photometric determination**



Supramolecular solid-phase extraction of ibuprofen and naproxen from sewage based on the formation of mixed supramolecular aggregates prior to their liquid chromatographic/photometric determination

Esther María Costi^a, Irina Goryacheva^b, María Dolores Sicilia^a, Soledad Rubio^a, Dolores Pérez-Bendito^{a,*}

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Córdoba, Edificio Anexo Marie Curie, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba, Spain

^b Department of Common and Inorganic Chemistry, Saratov State University, Astrakhanskaya 83, Saratov, Russia

Abstract

Sorbents made up of sodium dodecyl sulphate (SDS) hemimicelles, formed onto γ -alumina, were proposed for the quantitative and practically solvent-free solid-phase extraction (SPE) of ibuprofen and naproxen from sewage samples. The formation of drug–SDS mixed aggregates was proved by the pseudophase separation model and their composition as a function of the amount of drug was calculated. The overall hemimicellar SPE procedure consumed only 0.6 mL of methanol since non-organic solvent was required for cartridge conditioning and the drugs were completely eluted using 2 mL of a 0.3 M NaOH:metanol (70:30, v/v) solution. Breakthrough volumes of around 0.75 L and above 1 L were obtained for naproxen and ibuprofen, respectively. No clean-up steps were necessary for the determination of these drugs in sewage because the direct analysis of the eluates by liquid chromatography/UV was matrix effect-free. The identification of the analytes was based on retention times and UV spectra and it was confirmed by on-line fluorescence detection. The detection limits for naproxen and

ibuprofen were 0.8 and 9 ng L⁻¹ in wastewater influents and 0.5 and 7 ng L⁻¹ in effluents, respectively. These limits were similar to or lower than those achieved by methods based on conventional sorbents (e.g. C₁₈-silica or polymeric resins), which invariably require the evaporation of the eluates. The accuracy and precision of the proposed method were assessed by analysing influent and effluent wastewater samples spiked with 2 and 0.4 µg L⁻¹ of each analyte, respectively. The recoveries obtained and the corresponding standard deviations were in the ranges 93–101% and 2–9%. The method was applied to the determination of the target drugs in wastewater from three sewage treatment plants (STPs) in the south of Spain. The concentration of ibuprofen and naproxen ranged between 2.0 and 7.4 µg L⁻¹ and 0.9 and 3.3 µg L⁻¹ in influents and 0.4 and 1.4 µg L⁻¹ and 0.2 and 0.8 µg L⁻¹ in effluents, respectively.

1. Introduction

The growing worldwide consumption of pharmaceuticals and their proved occurrence in the environment has become an important issue in recent years. In 2006, the pharmaceutical world market came to 643 billion dollars, representing an increase of 7% compared to 2005. North America and Europe were by far the largest markets, accounting for about 48 and 30% share of the global market, respectively [1]. The pattern of consumed pharmaceuticals for the different countries was not identical, however, some drugs were regularly documented within the most frequently applied range and their presence in the environment has widely been reported [2]. Among them, acidic drugs with anti-inflammatory activity have been found in wastewater effluents and surface water in concentrations ranging from ng L^{-1} to $\mu\text{g L}^{-1}$ and constitute one of the pharmaceutical groups of major concern [2,3]. A review of the literature shows that ibuprofen and naproxen are often the acidic drugs present in the environment at the highest concentrations. In surface waters, typical levels are between 10 and 250 ng L^{-1} for ibuprofen and 8 and 280 ng L^{-1} for naproxen [3], although higher concentrations have been found in some streams (e.g. in Catalonia rivers 1.6 and 1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ of ibuprofen and naproxen, respectively [4]). Effluents from sewage treatment plants (STPs) are considered the most important source of these drugs in the environment. The ranges reported for ibuprofen and naproxen in STP effluents have been 0.01–8 and 0.02–12.5 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively [2,3], although the concentrations of ibuprofen found in hospital effluents were considerably higher (e.g. 1.5–151 $\mu\text{g L}^{-1}$ [5]). The removal of these drugs in STPs is highly variable (e.g. between 22 and 100% for ibuprofen and 15 and 100% for naproxen), so there is a need for sensible and reliable methods to check the efficiency of STPs for their removal in a routine way [2]. Nowadays, no conclusive data on the chronic toxicity of ibuprofen and naproxen have been reported [2].

The analysis of ibuprofen and naproxen in STPs has been mainly based on an enrichment step followed by their chromatographic separation and mass spectrometric detection. Among the sorbents used for their solid-phase extraction (mainly C_{18} -bonded silicas [6–8] and polymeric resins [8–15]), Oasis HLB, a copolymer of *m*-divinylbenzene and *n*-vinylpyrrolidone, has provided the best results [11–15]. High recoveries (>90%) have been reported for both analytes by using this sorbent material [11–13] as they were extracted from STP effluents, the extraction efficiency decreasing for STP influents (recovery factors = 50–80% [14,15]). Besides, the need for evaporating the SPE eluates from 8–15 mL to 0.5–1 mL [6–15] renders sample treatment laborious and time

consuming. The quantitation of ibuprofen and naproxen in wastewaters has largely been based on GC/MS despite derivatization is required and this makes the procedure prone to errors [8,9,11,14]. LC/MS, although more suitable for the analysis of these polar compounds, presents many quantification problems owing to the existence of matrix effects in general, and ion suppression in particular, mainly when highly contaminated samples are analysed [3]. MS techniques, although essential in drug multiresidue analysis, can be substituted for simpler, cheaper and more widely available ones in applications involving the routine analysis of specific, representative drugs [13].

This work deals with the development of a simple, cheap and accurate method for the routine determination of ibuprofen and naproxen, which are the most representative of acidic drugs in wastewaters, with the aim of controlling their removal efficiency in STPs and assessing their inputs into the aquatic environment. The method was based on the extraction/concentration of ibuprofen and naproxen in sodium dodecyl sulphate (SDS) hemimicelles adsorbed onto alumina and the direct analysis of the SPE eluates by liquid chromatography/diode array detection.

Hemimicelles and admicelles have emerged in the last few years as versatile sorbents for the extraction/preconcentration of organic pollutants from environmental aqueous samples prior to their determination by liquid chromatography (LC) [16–28]. They consist of surfactant aggregates adsorbed on charged surfaces such as mineral oxides and ion exchange resins. Analytes of very different nature, namely, surfactants [16–21], pesticides [22–24], phenolic compounds [25,26], phthalate esters [27] and estrogens [28], have been extracted from environmental waters using SDS/alumina [16–18,22,24,27,28]; cetylpyridinium chloride (CPC) [19] or cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) [21]/silica, mixed tetrabutylammonium chloride (TBAC)-SDS/alumina [23,25], SDS/anion exchange resin [20] and CPC/silica–magnetite [26]. The retention of pollutants on the surfactant aggregates has largely been based on hydrophobic, electrostatic and/or π -cation interactions. A major benefit of these sorbents is derived from the amphiphilic character of surfactants since their aggregates have different polarity regions where analytes of a wide polarity/charge range can be solubilised. Especially attractive is their application to the extraction of amphiphilic pollutants since the formation of analyte:sorbent mixed aggregates highly favours analyte retention because of the strong interactions between both the polar and apolar regions of analytes and sorbent material. This strategy has previously been exploited by our

research group for the extraction of surfactants [17,18] and this work tries to exploit this extraction mechanism for drugs.

The research here presented includes the study of the formation of drug–sorvent mixed aggregates, the optimisation of the experimental variables affecting both retention and elution of analytes, the determination of the analytical features of the method and its validation by the analysis of non-fortified and fortified influent and effluent samples collected from various STPs.

2. Experimental

2.1. Chemicals and materials

All reagents were of analytical grade and were used as supplied. Stock solutions of ibuprofen (Fluka, Buchs, Switzerland) and naproxen (Aldrich, Steinheim, Germany) were prepared in methanol at a concentration of 2 g L⁻¹ and stored in dark glass bottles at 4 °C. Under these conditions, they were stable at least for 1 month. Working solutions (20 mg L⁻¹ ibuprofen and 10 mg L⁻¹ naproxen) were prepared daily by appropriate dilution of the corresponding stock solution in methanol. SDS and γ -alumina were obtained from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany) and Sigma (St. Louis, MO, USA), respectively. The physical properties of γ -alumina were as follows: surface area, 155 m² g⁻¹; point of zero charge, pzc, 8.5; particle diameter range, 50–200 μ m; mean value, 100 μ m; mean pore size, 58 Å; density, 3.97 g cm⁻³. Bont Elut Jr. cartridges filled with 500 mg alumina were obtained from Varian (Mulgrave, Australia). HPLC-grade methanol, acetonitrile and phosphoric acid were purchased from Panreac (Seville, Spain). A 1.4×10⁻⁴ M Coomassie Brilliant Blue G (CBBG, Sigma) solution was prepared by dissolving 0.125 g of the dye in 1 L of distilled water with sonication for 15 min. This solution was prepared at least 24 h prior to use. The standard mixture of humic acids used in interference studies was obtained from Aldrich.

2.2. Determination of ibuprofen and naproxen in wastewater

2.2.1. Sample collection and preservation

Wastewater samples were collected from three different sewage treatment plants (STPs, Linares, Puente Genil and Bailén) in the South of Spain in May 2007. All of them are three-stage mechanical/biological plants serving populations of about 70,000 (Linares), 30,000 (Puente Genil) and 18,000 (Bailén) inhabitants. They receive a mixture of domestic and industrial wastewater, the inputs of domestic effluents (estimated from data supplied by STPs workers) being in the intervals 50–70%, 20–30% and 60–80% for Linares, Puente Genil and Bailén, respectively. Samples were collected in brown glass bottles and immediately filtered through 7–9 μm paper filters (Filter-lab, Barcelona, Spain) and 0.45 μm HNWP nylon membranes (Millipore, Bedford, MA, USA) for removing suspended solids. The pH of the filtered samples was adjusted to 2 by the addition of concentrated hydrochloric acid, and they were stored at 4 °C until analysis.

2.2.2. Supramolecular solid-phase extraction

Extractions were performed using a Supelco Visiprep (Bellefonte, PA, USA) vacuum manifold attached to a Rikakikai Eyela A35 (Tokyo, Japan) vacuum pump. The Bond Elut Jr. cartridge columns were conditioned with 5 mL of a 0.01 M hydrochloric acid solution. Then, hemimicelles were formed on the alumina by passing a 25 mL 0.01 M hydrochloric acid solution containing 40 mg of SDS. Afterwards, 750 mL of sewage (influent or effluent) was passed through the column at a rate of 5 mL min^{-1} . After the drying of the column under vacuum, ibuprofen and naproxen were eluted with 2 mL of a 0.3 M NaOH:methanol (70:30, v/v) solution at a rate of less than 1.0 mL min^{-1} by adjusting the vacuum to ca. 2 kPa. Finally, an aliquot (50 μL) of the eluate was injected into the liquid chromatographic system under the conditions specified below.

2.2.3. Liquid chromatographic analysis

The liquid chromatographic system used consisted of a TermoQuest Spectra System (San Jose, CA, USA) furnished with a P4000 quaternary pump, a SCM 1000 vacuum membrane degasser, an AS3000 auto sampler, with the injection volume set to 50 μL , a UV6000 LP diode-array detector and an FL3000 fluorescence detector. The stationary-

phase column was a 15-cm Kromasil C18 column (Milford, MA, USA) with 4.6 mm internal diameter and 5 μm particle diameter. The mobile phase used for the separation of ibuprofen and naproxen consisted of 63% acetonitrile:methanol (40:60) and 37% phosphoric acid (0.2%, v/v) at a flow rate of 1 mL min⁻¹. Calibrations were performed by injecting the analytes in methanol in the ranges 0.2–750 and 0.02–250 ng for ibuprofen and naproxen, respectively. They were quantified by measuring the peak areas obtained at 220 and 230 nm, respectively. Their identification in wastewater samples was based on the UV spectra and on-line fluorescence detection (at 254–290 and 230–420 nm, excitation-emission wavelengths), respectively.

2.3. Procedure for the detection of drug–SDS mixed aggregates

This study was carried out by using the mixed aggregate method, previously described by the authors, for the determination of amphiphilic compounds [29]. Briefly, the formation of mixed aggregates between two amphiphiles can be detected by measuring the critical micelle concentration of solutions containing individual and mixed amphiphiles, and this is easily performed by titration using a photometric probe. The equipment used for titrations consisted of a Metrohm 794 Basic Titrino titrator (Herisau, Switzerland) furnished equipped with a 20-mL autoburet, a fan stirrer and a titration vessel. The detection unit was a Metrohm 662 spectrophotometer furnished with an immersion probe (1-cm path length). The instrument control and data processing were performed using a computer made up of a Pentium 4 processor, a Microsoft Windows XP operating system and a Metrohm TiNet 2.5 Light software. The titration was made as follows: to a 25-mL volumetric flask were added, in sequence, 3.6 mL of 1.4×10^{-4} M Coomassie Brilliant Blue G solution, 0.25 mL of 1.0 M HCl, volumes of drug standard solution to give a final concentration between about 10^{-4} and 8.0×10^{-4} M and distilled water to the mark. This solution was placed in a 50-mL titration vessel and titrated with 0.02 M SDS delivered from the autoburet at a rate of 10 mL min⁻¹. The stirring rate was set at 700 rpm. Titration curves were obtained by recording the absorbance at 650 nm as a function of the titrant volume. The parameters C_s and C_s^M (see Eq. [2]) were calculated from the volumes of 0.02 M SDS consumed in titrations performed in the absence and in the presence of drug, respectively.

3. Results and discussion

3.1. Description and selection of the supramolecular sorbent

At the acidic pH values, SDS adsorbs on the surface of alumina oxide and forms two types of aggregates depending on the concentration of surfactant. Fig.1 shows the adsorption isotherm of SDS on alumina at pH 2. Firstly, SDS aggregates as hemimicelles formed through both ionic interactions between SDS molecules and positively charged groups in the γ -alumina surface and hydrophobic interactions between surfactant molecules. After the overall surface charge of the oxide is neutralized, further adsorption of SDS is solely driven by hydrophobic interactions and admicelles are formed. At the end of the hemimicellar/admicellar region, only admicelles are present onto the surface of the alumina. The maximum loads of SDS onto alumina in the hemimicellar and admicellar regions at pH 2 were about 80 and 180 mg of SDS per gram of mineral oxide, respectively [16,24], which were obtained by using total surfactant concentrations of 80 and 200 mg SDS g⁻¹ alumina.

In order to select the most suitable SDS aggregate for the SPE of ibuprofen and naproxen, the capability of hemimicelles, admicelles and their mixtures to adsolubilize these drugs was assessed. For this purpose, different amounts of SDS (0–200 mg) were added to a 25-mL aqueous solution at pH 2 containing 0.5 g of γ -alumina, 10 μ g of ibuprofen and 1.0 μ g of naproxen. The aqueous suspension was vigorously stirred for 5 min, centrifuged at 4000 rpm for 10 min and the concentration of ibuprofen and naproxen was determined in the supernatant by LC/UV, as specified in Section 2. At the analyte concentrations used in this experiment (0.4 mg L⁻¹ for ibuprofen and 0.04 mg L⁻¹ for naproxen), percentages of adsolubilization up to 99% could be determined by the direct measurement of the remaining analyte in the supernatants.

Some representative results are shown in Table 1. In the absence of SDS, both ibuprofen (pK_a 4.9; log K_{ow} 4.0) and naproxen (pK_a 4.2; log K_{ow} 3.2) were partially retained on γ -alumina. The adsolubilization increased in the presence of SDS aggregates, the analytes being quantitatively retained over a wide anionic surfactant concentration range (50–200 mg SDS g⁻¹ alumina). Although both hemimicelles and admicelles were efficient sorbent materials, hemimicelles (formed using 80 mg SDS g⁻¹ alumina) were selected on the basis of experimental convenience. Thus, the low

concentration of monomeric SDS in equilibrium with hemimicelles (lower than 5×10^{-3} mg L⁻¹, see Fig. 1) was permitted to use these aggregates in SPE without the supply of the surfactant during operation. On the contrary, a supply of SDS is needed in the hemimicellar/admicellar and admicellar regions to keep constant the initial conditions selected and guarantee a unique partition constant for analytes.

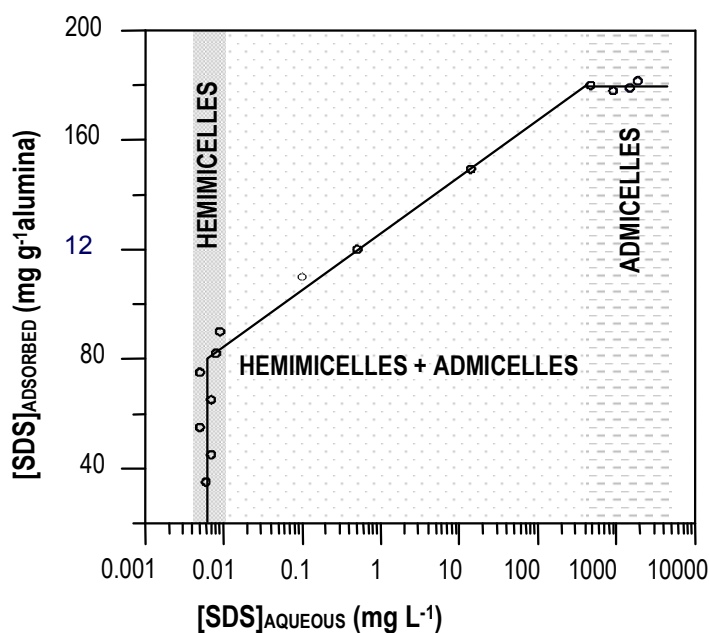


Fig. 1. Experimental adsorption isotherm for SDS on alumina at pH 2.

Table 1. Effect of the SDS concentration used to form hemimicelles, hemimicelles/admicelles and admicelles on γ -alumina at pH 2 on the percentage of adsolubilization obtained for ibuprofen and naproxen.

Supramolecular aggregates	Surfactant concentration (mg SDS g ⁻¹ alumina)	Percentage of drug adsolubilized	
		Ibuprofen	Naproxen
Hemimicelles	0	19	45
	15	84	92
	50	≥99	≥99
	80	≥99	≥99
Hemimicelles/admicelles	150	≥99	≥99
Admicelles	200	≥99	≥99

3.2. Amphiphilic association of SDS and drugs as the basis of the supramolecular extraction

Non-steroidal anti-inflammatory drugs, such as ibuprofen and naproxen, are amphiphilic substances capable of self-association in aqueous solutions [30]. Usually, their critical micelle concentration (CMC) is very high. For example, the CMC of the sodium salt of ibuprofen in pure water is 180 mM [31]. In an acidic aqueous medium, these drugs are protonated and their solubility greatly decreases (1.5 and 2.5 mM for naproxen and ibuprofen, respectively, at pH 2 [32]). The formation of drug micellar aggregates in this medium has not been reported till date. However, like other carboxylic acids, ibuprofen and naproxen are both hydrogen bond donors and acceptors and therefore they should associate at least as dimers [33]. On the other hand, drugs are capable of associating with other amphiphilic molecules such as surfactants [34].

The formation of ibuprofen-SDS and naproxen-SDS mixed aggregates was investigated at the pH of the hemimicellar extraction (pH 2) by using the pseudophase separation approach [35] and the mixed aggregate method [35]. In the pseudophase model, the CMC of the mixed aggregate (C^*) is given in terms of the mole fractions of each component (α_i), the CMC of the pure components (C_i) and their activity coefficients in the mixed micelle (f_i):

$$\frac{1}{C^*} = \sum_{i=1}^n \frac{\alpha_i}{f_i C_i} \quad (1)$$

In the mixed aggregate method, Eq. [1] is rearranged as follows:

$$1 - \frac{C_s^M}{C_s} = \frac{1}{f_d C_d} C_d^M \quad (2)$$

where the subscripts s and d refer to SDS and drug, and C_d^M and C_s^M are the concentrations of drug and SDS, respectively, in the solution as the C^* is reached. If mixed aggregates are formed, the plotting of $1 - (C_s^M/C_s)$ versus C_d^M will be linear. The parameter $1 - (C_s^M/C_s)$ was calculated by titration of ibuprofen or naproxen with SDS according to the procedure described in Section 2.3. Fig. 2A shows the results

obtained. A linear dependence was found for both ibuprofen and naproxen, thus proving fit to Eq. [2] and the formation of mixed aggregates. Their slopes and correlation coefficients were 0.33 ± 0.02 and 0.62 ± 0.03 , and 0.9992 and 0.997 for ibuprofen and naproxen, respectively.

The composition of the mixed aggregates as a function of C_d^M was investigated. For this purpose, the dependence of the mole fraction of the drug in the mixed aggregate (x_d) on the mole fraction of the drug in the solution (α_d) was found. Both parameters were calculated from the data obtained in Section 2.3 by using the following equations:

$$x_d = 1 - \frac{C_s^M}{C_s} \quad (3)$$

$$\alpha_d = \frac{C_d^M}{C_d^M + C_s^M} \quad (4)$$

Fig. 2B shows the results obtained. The molar fraction of ibuprofen and naproxen in the mixed aggregate increased linearly as their solution molar fraction did, the dependence being similar to that found for some surfactant mixtures [36]. The strong cooperative association of ibuprofen and naproxen with SDS suggests the formation of mixed aggregates through both hydrophobic and hydrogen bond interactions, which is possible at the end of the hemimicellar region by the existence of patches of admicelles [37]. This strong association should permit the development of robust and high-breakthrough extraction methods.

3.3. Selection of the desorption solution

Different solvents known to disrupt SDS aggregates-coated alumina (methanol, ethanol, acetonitrile, propanol and tetrahydrofuran [16-23,25]) and basic solutions (NaOH and NaOH:methanol mixtures) were investigated for the elution of the analytes. The experiments were performed by SPE of 25 mL-aqueous solutions containing 200 ng of ibuprofen and 40 ng of naproxen at pH 2, and using volumes of eluent in the interval 0.5-2 mL. Experiments were made in duplicate.

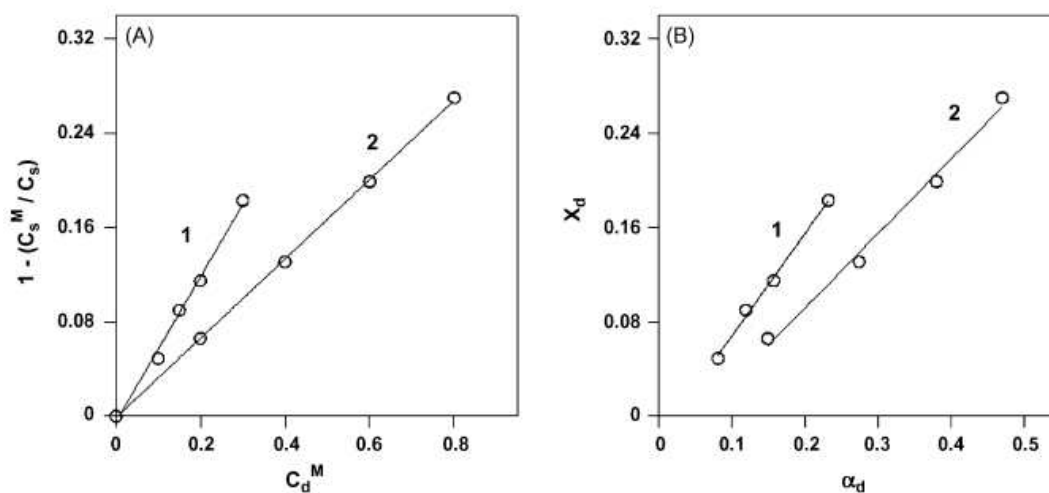


Fig. 2. (A) Variation of $1 - (C_s^M / C_s)$ as a function of the drug concentration (C_d^M). (B) Dependence of the mole fraction of the drug (x_d) in the mixed aggregate on the mole fraction of drug in the solution (α_d). (1) Naproxen and (2) ibuprofen.

Organic solvents were unable to effectively elute ibuprofen and naproxen from SDS hemimicelles, methanol providing the highest recoveries ($36 \pm 4\%$ for ibuprofen and $37 \pm 4\%$ for naproxen using 2 mL of methanol). The low elution capability of these solvents was probably due to the strong interactions between the drugs and SDS in the mixed aggregates. The elution was improved by using basic solutions, which caused the breaking of SDS–alumina bonds (e.g. the recoveries were $88 \pm 4\%$ and $88 \pm 3\%$ for ibuprofen and naproxen, respectively, in 2 mL of 0.3 M NaOH). The use of NaOH concentrations greater than 0.3 M was inadvisable because it interfered in the chromatographic determination by decreasing the peak areas of both ibuprofen and naproxen. The analytes were quantitatively eluted using 2 mL of 0.3 M NaOH:methanol mixtures with organic solvent percentages within the interval 10–90%. Lower volumes of this desorption solution did not provide complete elution of the analytes (e.g. recovery factors of $68 \pm 8\%$ for ibuprofen and $78 \pm 5\%$ for naproxen were obtained using 1.5 mL of 0.3 M NaOH:methanol, 70:30, v/v).

The elution flow rate was a key factor to get quantitative recoveries. Ibuprofen and naproxen were completely eluted from SDS hemimicelles using flow rates lower than 1 mL min^{-1} . Higher elution rates resulted in decreased desorption percentages (e.g. at a flow rate of 2 mL min^{-1} , recovery factor was $67 \pm 2\%$ for ibuprofen and $82 \pm 3\%$ for naproxen).

3.4. Sample loading volume

The breakthrough volume was determined by passing increasing volumes (0.025–1 L) of an aqueous solution containing 200 ng of ibuprofen and 40 ng of naproxen (concentrations in the intervals 0.2–8 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 0.04–1.6 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively) at pH 2 through the hemimicellar cartridge, determining the concentration of each analyte in the eluate. Breakthrough was considered to occur when the amount of analyte retained decreased about 5%. Naproxen was quantitatively retained on SDS hemimicelles at the maximum sample volume tested (1 L) and a breakthrough volume of 750 mL was obtained for ibuprofen.

3.5. Analytical performance

Table 2 shows the calibration parameters obtained from standards of ibuprofen and naproxen in methanol when analysed by LC/diode array detection (DAD). Instrumental quantitation limits were obtained by using a signal-to-noise ratio of 10 (the ratio between the peak areas for each drug and peak area of noise). Correlations between peak areas and the amount of analytes were determined by linear regression and the values obtained (Table 2) indicated good fits. The detection limits of the method [39] were estimated from six independent complete analyses (Section 2.2) of 750 mL of influent and effluent wastewater samples by using a signal-to-noise ratio of 3. Since no typical matrix low-level material could be obtained, an estimate of the background signal was made at a representative part of the readout, adjacent to the analyte signal, in the analyte-containing sample. Detection limits at the low ng L^{-1} were obtained for both drugs.

The precision was evaluated by applying the whole analytical process to 11 independent influent and effluent wastewater samples from the Bailén STP. The relative standard deviations obtained were 1.8% and 1.6%, and 2.4% and 3.1% for ibuprofen and naproxen, respectively (analyte concentrations in Table 3).

The effect of humic acids on the extraction efficiency of the target drugs was investigated because these organic substances are amphiphilic and could form mixed aggregates with SDS, thus competing with the analytes by the adsorption sites in the hemimicellar sorbent. The study was performed by applying the whole analytical process to 750 mL solutions containing 40 ng of naproxen, 200 ng of ibuprofen and humic acids at concentrations comprised between 0 and 50 mg L^{-1} . As the pH of these

solutions was adjusted to 2, precipitation of a fraction of humic acids occurred. This precipitate was separated from the aqueous solution using the filtration procedure described for sewage samples (Section 2.2.1). No interference from soluble humic acids over the whole concentration range tested on the determination of the drugs was observed.

3.6. Determination of ibuprofen and naproxen in wastewater

The hemimicellar SPE-LC-Diode Array Detection (DAD) method was applied to the determination of ibuprofen and naproxen in influent and effluent wastewater samples from three different STPs. Table 3 shows the concentrations found and the recoveries obtained after spiking the influents and effluents with 2 and 0.4 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively, of each drug. Values for concentrations of the drugs and recoveries were expressed as the mean value of three independent determinations, besides their corresponding standard deviations. No matrix effects on the extraction capability of the hemimicellar sorbent were observed; recoveries were in the intervals 94–101% and 93–98% for ibuprofen and naproxen, respectively, with standard deviations of the percent recovery varying between 2 and 9%. The identification of analytes was based on retention times, UV spectra and fluorescence detection.

Ibuprofen and naproxen were detected in all the wastewater samples analysed, indicating their ubiquity and the need of studying their fate and distribution in the aquatic environment. The presence of these pharmaceuticals in the effluents proved that the STPs investigated were unable to effectively remove them being the percentage of removal highly variable, which agreed with previous studies [2,38].

Fig. 3 shows the chromatograms obtained from a standard solution containing ibuprofen and naproxen using UV (A1) and fluorescence (B1) detection. The figure also includes the chromatograms obtained from the analysis of an influent sample collected in the Puente Genil STP (Panel 2) and those belonging at the same sample fortified with 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ of each acidic drug (Panel 3). The UV spectra obtained for ibuprofen and naproxen from analysed samples and standard solutions were identical. No interference from matrix components was detected for any of the samples analysed.

Table 2. Instrumental calibration parameters for ibuprofen and naproxen by LC-DAD and detection limits for the hemimicellar SPE-LC-DAD of the analytes in wastewater

Drug	Calibration parameters				Detection limits in wastewater ^a (ng L ⁻¹)		
	Linear concentration range ^b (ng)	Slope±s (ng ⁻¹)x10 ⁴	Intercept±s x 10 ⁴	r ^c	S _{x/y} ^d x 10 ⁴	Influent	Effluent
Ibuprofen	0.2-750	1.033±0.004	-1.2±1.2	0.9997	2.6	9	7
Naproxen	0.02-250	8.52±0.05	-1.1±2.1	0.99993	4.2	0.8	0.5

^aCalculated from six independent complete analysis (experimental procedure in Section 2.2) of 750 mL-influent and effluent samples

^bInstrumental quantitation limit calculated by using a signal-to-noise ratio of 10

^cCorrelation coefficient

^dStandard error of the estimate

Table 3. Concentration of ibuprofen and naproxen found in non-spiked and spiked sewage samples, and recoveries obtained by the proposed method

Sample	Concentration added ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Concentration found ^a \pm s ^b ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Recovery \pm s (%)	
	Ibuprofen	Naproxen	Ibuprofen	Naproxen	Ibuprofen	Naproxen
Linares influent	0	0	7.4 \pm 0.1	3.28 \pm 0.07		
	2.0	2.0	9.4 \pm 0.1	5.2 \pm 0.1	98 \pm 9	98 \pm 5
Linares effluent	0	0	1.36 \pm 0.03	0.161 \pm 0.005		
	0.4	0.4	1.76 \pm 0.03	0.54 \pm 0.02	101 \pm 8	95 \pm 5
Puente Genil influent	0	0	2.0 \pm 0.1	0.99 \pm 0.05		
	2.0	2.0	3.88 \pm 0.05	2.85 \pm 0.02	94 \pm 6	93 \pm 3
Puente Genil effluent	0	0	1.293 \pm 0.009	0.82 \pm 0.04		
	0.4	0.4	1.68 \pm 0.02	1.20 \pm 0.04	97 \pm 5	96 \pm 9
Bailén influent	0	0	2.41 \pm 0.02	0.931 \pm 0.003		
	2.0	2.0	4.33 \pm 0.05	2.83 \pm 0.03	96 \pm 3	95 \pm 2
Bailén effluent	0	0	0.369 \pm 0.009	0.16 \pm 0.005		
	0.4	0.4	0.74 \pm 0.01	0.54 \pm 0.002	94 \pm 3	98 \pm 5

^a Mean of three independent determinations.^b Standard deviation

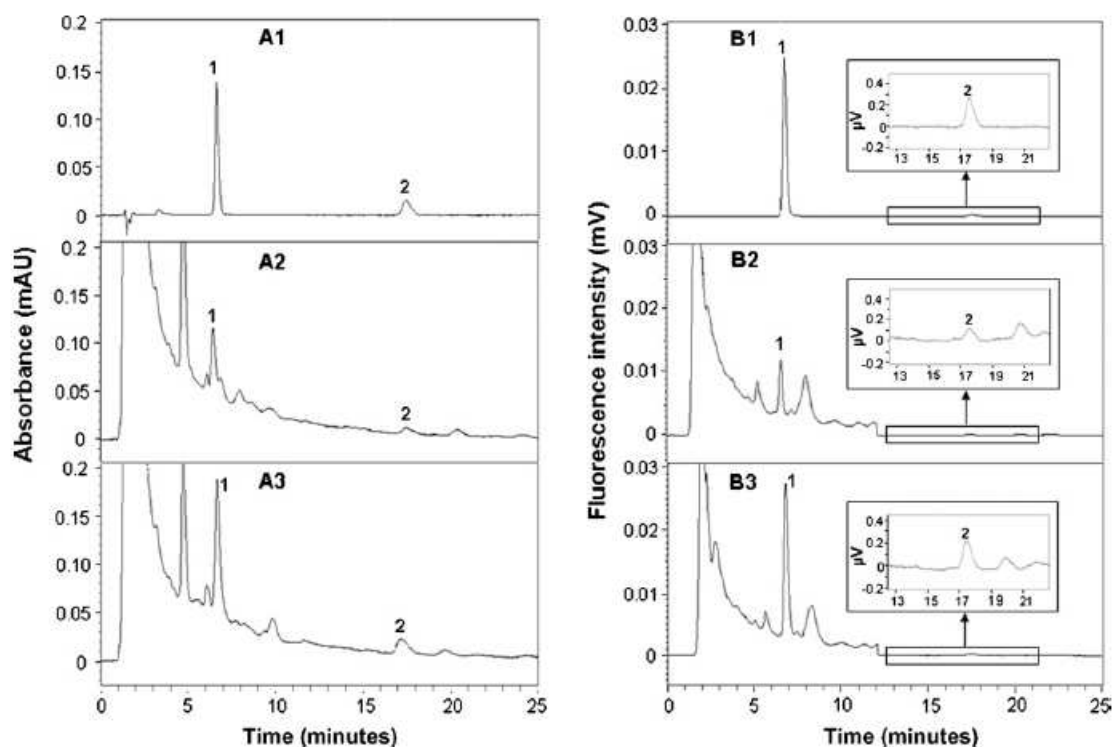


Fig. 3. Chromatograms obtained by (A) UV and (B) fluorescence measurements from (1) a standard solution containing 1.4 mg L^{-1} ibuprofen and 1.2 mg L^{-1} naproxen and from (2, 3) an influent sample obtained from the Puente Genil sewage treatment plant in Córdoba (Spain), (2) non-spiked and (3) spiked with $2.0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ of each analyte. Peak identification: (1) naproxen and (2) ibuprofen.

4. Conclusions

The formation of drug–surfactant mixed aggregates has the potential of being a useful strategy for the supramolecular SPE of a broad range of drugs because most of them are amphiphilic. The amphiphiles making up the mixed aggregate can interact through both the head groups and the hydrophobic region and this causes the strong retention of analytes. Their elution from the supramolecular sorbent is easily made under pH conditions at which both the surfactant and the mineral oxide have the same charge. The combination of the two factors, namely high retention and easy elution, permits to reach high concentration factors without the need of evaporating the eluates, which is a common practice when high retention sorbents, such as polymeric or carbon-based sorbents, are used.

In this work, hemimicelles of SDS formed on γ -alumina provided excellent features for the SPE of ibuprofen and naproxen from sewage samples. Unlike conventional sorbents [14,15], the matrix of the sample did not affect the extraction efficiency of the hemimicellar sorbent, which provided quantitative recoveries using high sample loading volumes (750 mL) even for highly contaminated water samples (i.e. STP influents). The detection limits obtained for ibuprofen and naproxen (at the low ng L⁻¹ level) were far below the usual concentrations found in wastewater. The simplicity of the analytical procedure, their analytical features and the availability of LC/DAD in most of labs make the method advisable for the routine determination of ibuprofen and naproxen in wastewaters with the aim of using these drugs as indicators of the input of non-steroidal anti-inflammatory drugs into the environment from STPs.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support from MEC (Project No. CTQ2005-00643). The first author acknowledges the Andalusian CICYE for a postgraduate fellowship.

References

- [1] Intercontinental Medical Statistics World Review, IMSworld Publications, London, 2006.
- [2] K. Fent, A.A. Weston, D. Caminada, *Aquat. Toxicol.* 76 (2006) 122.
- [3] M. Gros, M. Petrović, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 941.
- [4] M. Farré, I. Ferrer, A. Ginebreda, M. Figueras, L. Olivella, Ll. Tirapu, M. Vilanova, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 187.
- [5] M.J. Gómez, M. Petrović, A.R. Fernández-Alba, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 1114 (2006) 224.
- [6] M.D. Hernando, E. Heath, M. Petrovic, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 985.
- [7] T.A. Ternes, *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 419.
- [8] A. Togola, H. Budzinski, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 627.
- [9] F. Sacher, F.T. Lange, H. Brauch, I. Blankenhorn, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 199.
- [10] J.B. Quintana, T. Reemtsma, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 765.
- [11] I. Rodríguez, J.B. Quintana, J. Carpinteiro, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 985 (2003) 265.
- [12] S. Öllers, Heinz, P. Singer, P. Fässler, S.R. Müller, *J. Chromatogr. A* 911 (2001) 225.
- [13] J.L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso, M. Callejón, *Anal. Chim. Acta* 550 (2005) 116.
- [14] R. Gibson, E. Becerril-Bravo, V. Silva-Castro, B. Jiménez, *J. Chromatogr. A* 1169 (2007) 31.
- [15] M. Pedrouzo, S. Reverté, F. Borrull, E. Pocurull, R.M. Marcé, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 297.
- [16] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6799.
- [17] M. Cantero, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 161.
- [18] M. Cantero, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1120 (2006) 260.
- [19] L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Analyst* 131 (2006) 835.
- [20] J.K. Autry, E.G. Vaught, E.D. Conte, *Microchem. J.* 80 (2005) 25.
- [21] X.L. Zhao, J.D. Li, Y.L. Shi, Y.Q. Cai, S.F. Mou, G.B. Jiang, *J. Chromatogr. A* 1145 (2007) 52.
- [22] A. Moral, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 569 (2006) 132.

- [23] A. Moral, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 608 (2008) 61.
- [24] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 76 (2004) 3878.
- [25] A. Moral, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1100 (2005) 8.
- [26] X. Zhao, Y. Shi, T. Wang, Y. Cai, G. Jiang, *J. Chromatogr. A* 1188 (2008) 140.
- [27] F.J. López-Jiménez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 551 (2005) 142.
- [28] A. García-Prieto, L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Analyst* 131 (2006) 1.
- [29] E. Borrego, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 241.
- [30] A.T. Florence, D. Attwood, *Physicochemical Principles of Pharmacy*, 3rd ed., Macmillan, London, 1998, p. 199.
- [31] A. Ridell, H. Evertsson, S. Nilsson, L.O. Sundelöf, *J. Pharm. Sci.* 88 (1999) 1175.
- [32] SciFinder Scholar Data Base, American Chemical Society, Washington, DC, modified version April 15, 2007. <http://libraries.mit.edu/guides/cheatsheets/sci-finder/index.html>.
- [33] R.T. Morrison, R.N. Boyd, *Organic Chemistry*, 6th ed., Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ, 1992 (Ch. 19).
- [34] A. Pedraza, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Analyst* 131 (2006) 81.
- [35] P.M. Holland, in: P.M. Holland, D.N. Rubingh (Eds.), *Mixed Surfactant Systems* (ACS Symposium Series, No. 501), American Chemical Society, Washington, DC, 1992 (Ch. 2).
- [36] D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 67 (1995) 1872.
- [37] G.M. Førland, T. Rahman, H. Hørland, K.J. Børve, *J. Colloid Interf. Sci.* 182 (1996) 348.
- [38] M. Carballa, F. Omil, J.M. Lema, M. Llompert, C. García-Jares, I. Rodríguez, M. Gómez, T. Ternes, *Water Res.* 38 (2004) 2918.
- [39] M. Thompson, S.L.R. Ellison, R. Wood, *Pure Appl. Chem.* 74 (2002) 835.



**RESUMEN Y DISCUSIÓN
DE LOS RESULTADOS**

RESUMEN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En esta Memoria se ha abordado el estudio del uso de sistemas supramoleculares en dos etapas concretas del proceso de medida químico; determinación y extracción/preconcentración. En el primer caso, se han desarrollado varias aplicaciones del método de grado de enlace tensioactivo-colorante para el control de calidad de fármacos; y en el segundo, se han desarrollado diferentes métodos para el control de calidad de alimentos y de la contaminación de sistemas acuáticos ambientales.

En los distintos apartados de este Capítulo se pretende ofrecer una panorámica general de los resultados más relevantes obtenidos. Para ello, se discuten distintos aspectos relacionados con las muestras analizadas, los analitos determinados, los factores que afectan a las variables experimentales, las características analíticas de los métodos propuestos y la aplicabilidad de los mismos al análisis de muestras reales.

1. Problemas analíticos abordados: Muestras y Analitos

Se ha abordado el estudio de un gran número de muestras en tres ámbitos del análisis químico: farmacología, alimentación y medioambiente. Entre los fármacos analizados se incluyen pomadas, cremas, polvos, soluciones líquidas y comprimidos. Los alimentos en los que hemos centrado nuestras investigaciones son de origen animal e incluyen carnes de cerdo, pollo, pavo, ternera y cordero, salmón, trucha asalmonada, gallo, dorada, lubina y gambas. Por último, se han desarrollado métodos para el análisis de influentes y efluentes en aguas residuales. La gran variedad de matrices implicadas, con la consiguiente variación en composición de las mismas, indica que las metodologías propuestas son versátiles y ampliamente aplicables.

De acuerdo con el objetivo de la Tesis, los analitos determinados fueron drogas con diferente estructura y actividad farmacológica. En total se investigaron 22 drogas pertenecientes a 4 grupos terapéuticos: antibióticos, antiinflamatorios, antisépticos y contraceptivos, que tienen en común su amplio uso en medicina humana y veterinaria. Los antibióticos estudiados pertenecen al grupo de los fusidanos (ácido fusídico y fusidato sódico), las quinolonas (ácido oxolínico y flumequina) y las sulfonamidas (sulfadiazina, sulfamerazina, sulfametoxipiridazina, sulfadoxina, sulfametoxazol, sulfadimetoxina y sulfaquinoxalina). Los antiinflamatorios no esteroideos seleccionados fueron el naproxeno e ibuprofeno. Y finalmente, los antisépticos estudiados son el cloruro

de dodecilbenzalconio, cloruro de cetalconio, cloruro de bencetonio, cloruro de metilbencetonio, bromuro de cetrimonio, cetrimida, cloruro de cetilpiridinio y cloruro de benzalconio, también usado como contraceptivo. Dada la diversidad de estructuras moleculares abordadas, las conclusiones extraídas de las investigaciones que se presentan pueden servir de base para predecir la aplicabilidad de las metodologías propuestas a la determinación de otras drogas no investigadas en esta Memoria.

2. Metodologías basadas en la medida de parámetros de agregación para la determinación de drogas terapéuticas en fármacos

El objetivo general de estas metodologías es el desarrollo de procedimientos muy selectivos para la determinación de principios activos en fármacos con la finalidad de establecer métodos rápidos, simples y de bajo coste que permitan el control de calidad de los mismos. En la Parte I de esta Memoria nuestras investigaciones se han centrado en profundizar en las bases teóricas y prácticas de la metodología de grado de enlace tensioactivo-colorante, con el objetivo de establecer el tipo de drogas a las que es aplicable, el mecanismo de actuación de los analitos y la dependencia de características analíticas tales como sensibilidad, selectividad, precisión, etc., con diferentes factores.

De acuerdo con investigaciones previas desarrolladas en nuestro grupo de investigación, el método de grado de enlace tensioactivo-colorante es aplicable a compuestos anfifílicos e hidrotópicos capaces de formar agregados en disolución mediante interacciones moleculares. Así, las drogas terapéuticas seleccionadas fueron antibióticos, antisépticos y contraceptivos que tienen estructuras con regiones hidrófobas (anillos aromáticos, cadenas hidrocarbonadas, etc.) e hidrófilas (grupos de amonio cuaternario y carboxílicos) bien definidas.

2.1. Mecanismo de actuación de los analitos

El método de grado de enlace tensioactivo-colorante se basa en la formación de agregados mixtos entre un tensioactivo reactivo y un colorante anfifílico de carga opuesta, que a su vez actúa como sonda fotométrica para la detección de los agregados mixtos formados. Cuando en el medio existe un analito capaz de formar agregados mixtos con el tensioactivo reactivo, se establece una competencia entre ambos tipos de agregados de forma que ahora el grado de enlace tensioactivo reactivo-colorante depende de la cantidad de agregados tensioactivo reactivo-analito formados.

Operacionalmente, los agregados implicados en la disolución blanco y en la muestra (Figura 1 a y b, respectivamente) se forman secuencialmente al añadir desde una bureta el tensioactivo reactivo a las disoluciones que contienen sólo colorante o la mezcla de colorante y analito. El grado de enlace o estequiometría tensioactivo-colorante detectado en el punto final de la curva de valoración en la disolución blanco depende de los cambios espectrales experimentados por el colorante en el microambiente proporcionado por los diferentes agregados mixtos secuencialmente formados (Figura 1a). En la muestra, a medida que se adiciona el valorante al vaso de valoración se produce la formación simultánea de agregados mixtos tensioactivo-colorante y tensioactivo-analito, y por lo tanto, para alcanzar el mismo grado de enlace tensioactivo-colorante que en la disolución blanco, se requerirá mayor volumen de valorante (Figura 1b). Esta diferencia de volumen es el parámetro experimental que, convenientemente transformado (ecuación 4, página 61), se relaciona con la concentración de analito en la muestra.

La formación secuencial de agregados mixtos tensioactivo-colorante se ha demostrado, en investigaciones previas realizadas por nuestro grupo de investigación, mediante la monitorización de los cambios espectrales producidos en el colorante al adicionar diferentes concentraciones de tensioactivo reactivo. En esta Memoria se ha demostrado la formación de agregados mixtos de diferente estequiometría entre las drogas investigadas y el tensioactivo reactivo midiendo la intensidad de la radiación dispersada en función de la relación molar tensioactivo reactivo/analito. En las Figuras 2 y 3 se muestran como ejemplo las estequiometrías detectadas para los agregados formados entre bromuro de didodecildimetilamonio (BrDDA) y fusidato sódico y dodecilsulfato sódico (SDS) y cloruro de cetilconio, respectivamente.

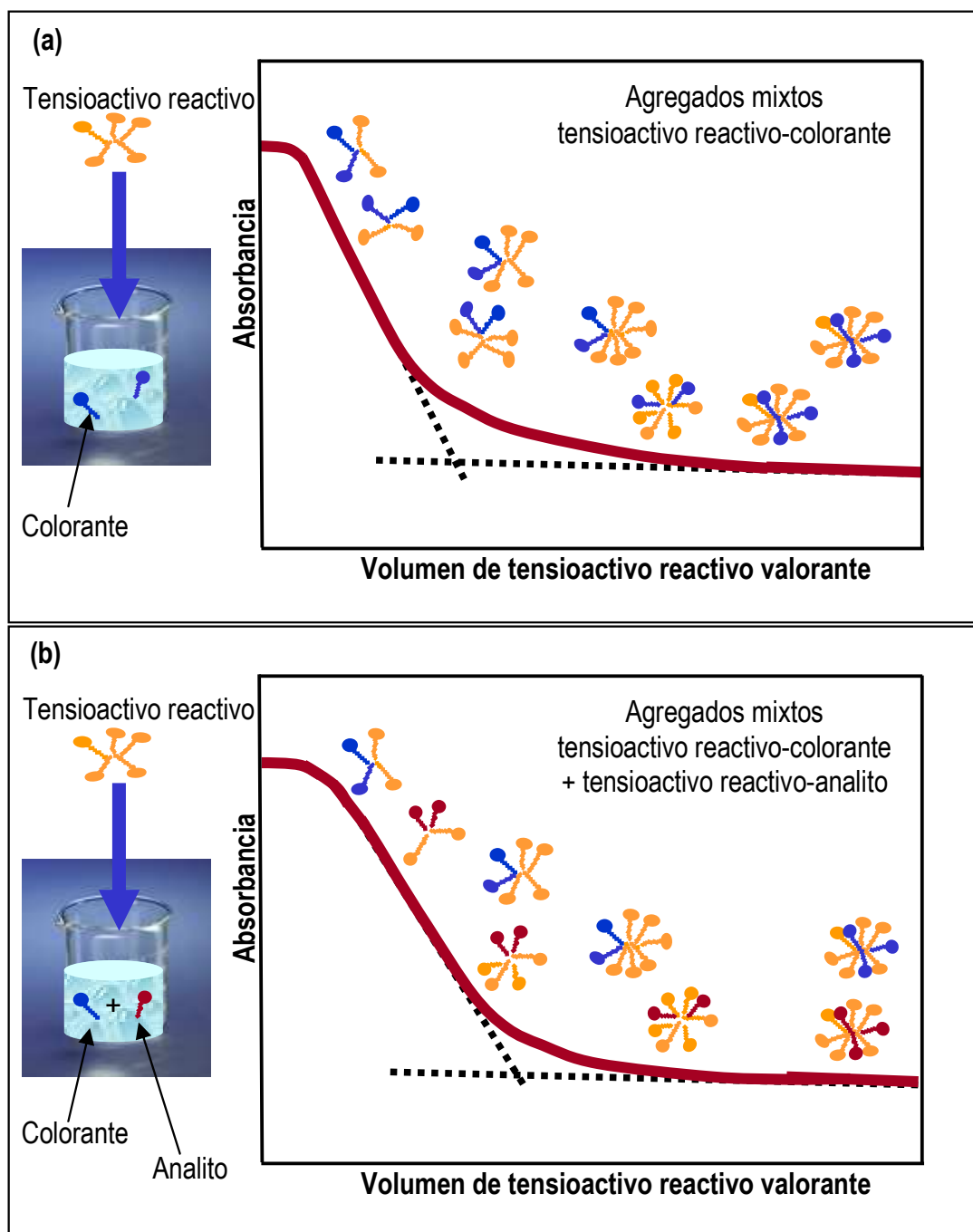


Figura 1. Mecanismo de actuación de los analitos durante la valoración fotométrica (a) en la disolución blanco y (b) en la muestra.

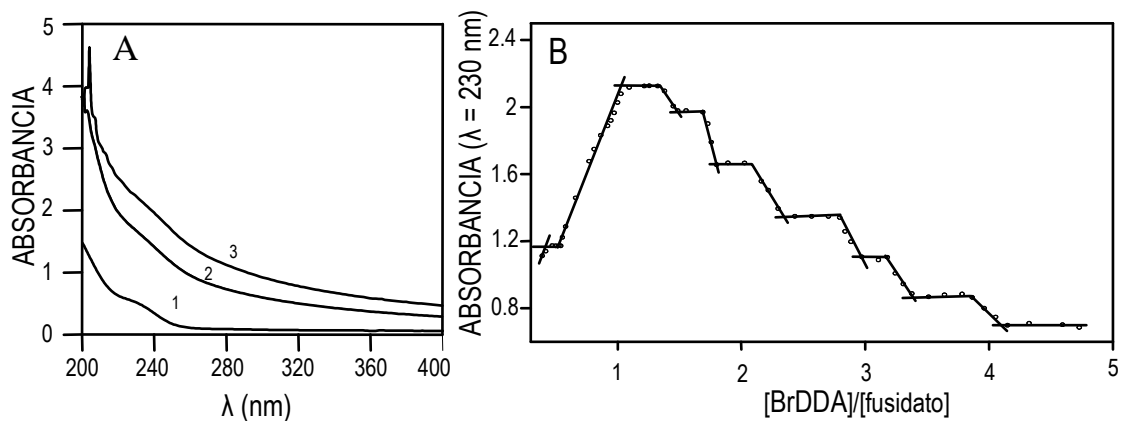


Figura 2. (A) Espectro del fusidato sódico (74 μM) en (1) ausencia y (2,3) presencia de BrDDA (2) 74 μM y (3) 150 μM; (B) Variación de la absorbancia del fusidato sódico (74 μM) a 230 nm en función de la relación molar [BrDDA]/[fusidato sódico]; [TEA buffer] = 0,05 M; pH = 7,0.

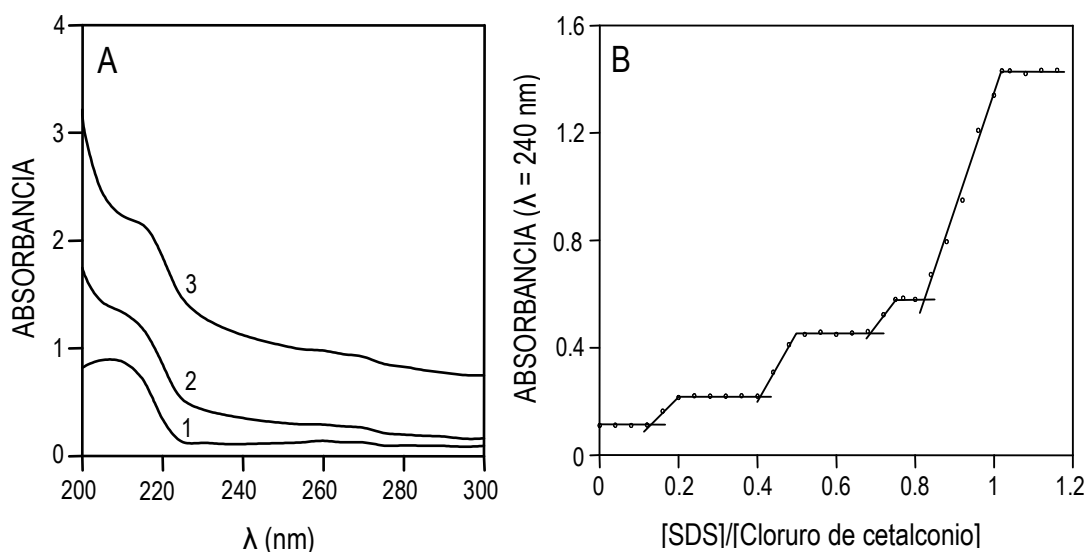


Figura 3. (A) Espectro del cloruro de cetalconio (100 μM) en (1) ausencia y (2,3) presencia de SDS (2) 50 μM y (3) 100 μM. (B) Variación de la absorbancia del cloruro de cetalconio (100 μM) a 240 nm en función de la relación molar [SDS]/[cloruro de cetalconio].

De acuerdo con los requisitos que debe cumplir el sistema químico utilizado en el método de grado de enlace tensioactivo-colorante, especificados en la introducción de la primera parte de esta Memoria, el sistema químico seleccionado para la determinación de fusidanos ha sido el formado por el colorante aniónico Coomassie azul brillante G (CABG) y el tensioactivo reactivo bromuro de didodecildimetilamonio (BrDDA), mientras que el sistema químico seleccionado para la determinación de tensioactivos catiónicos ha sido el formado por el colorante catiónico acetato de violeta de cresilo (VC) y el tensioactivo reactivo dodecilsulfato sódico (SDS). En ambos casos el tensioactivo reactivo tiene carga opuesta a la de los analitos, lo que favorece la formación de agregados mixtos tensioactivo-analito, y el colorante tiene la misma carga que los analitos, lo que dificulta la interacción colorante-analito.

2.2. Factores que afectan a la sensibilidad del método

La sensibilidad del método de grado de enlace tensioactivo-colorante viene dada por el valor de grado de enlace tensioactivo-analito alcanzado en el punto final de la valoración, β_A [ver ecuación (4) en la introducción de la primera parte de esta Memoria]. A continuación se discuten los factores que afectan a la sensibilidad del método de acuerdo con los resultados obtenidos en esta Memoria.

A. Estructura molecular del analito. Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación han demostrado que la estructura molecular del analito es un factor clave en la sensibilidad obtenida con el método de grado de enlace, ya que de ella depende la energía del enlace entre las moléculas del tensioactivo reactivo y el analito en el agregado mixto. Las diferencias estructurales entre los tensioactivos catiónicos estudiados en esta Tesis Doctoral (Tabla 1, página 97) apenas afectaron al valor de β_A obtenido (Tabla 2, página 100) probablemente debido a que la energía del enlace tensioactivo reactivo-analito estuvo fundamentalmente determinada por las interacciones electrostáticas atractivas entre el grupo sulfato del SDS y los grupos de amonio cuaternario o piridinio de los tensioactivos catiónicos y las interacciones hidrófobas contribuyeron comparativamente en menor medida.

B. Variables experimentales. En las Figuras 4 y 5 se muestra la influencia de las diferentes variables investigadas en los valores de m_T^* , m_T y del parámetro de medida obtenidos para la determinación de fusidanos y tensioactivos catiónicos, respectivamente.

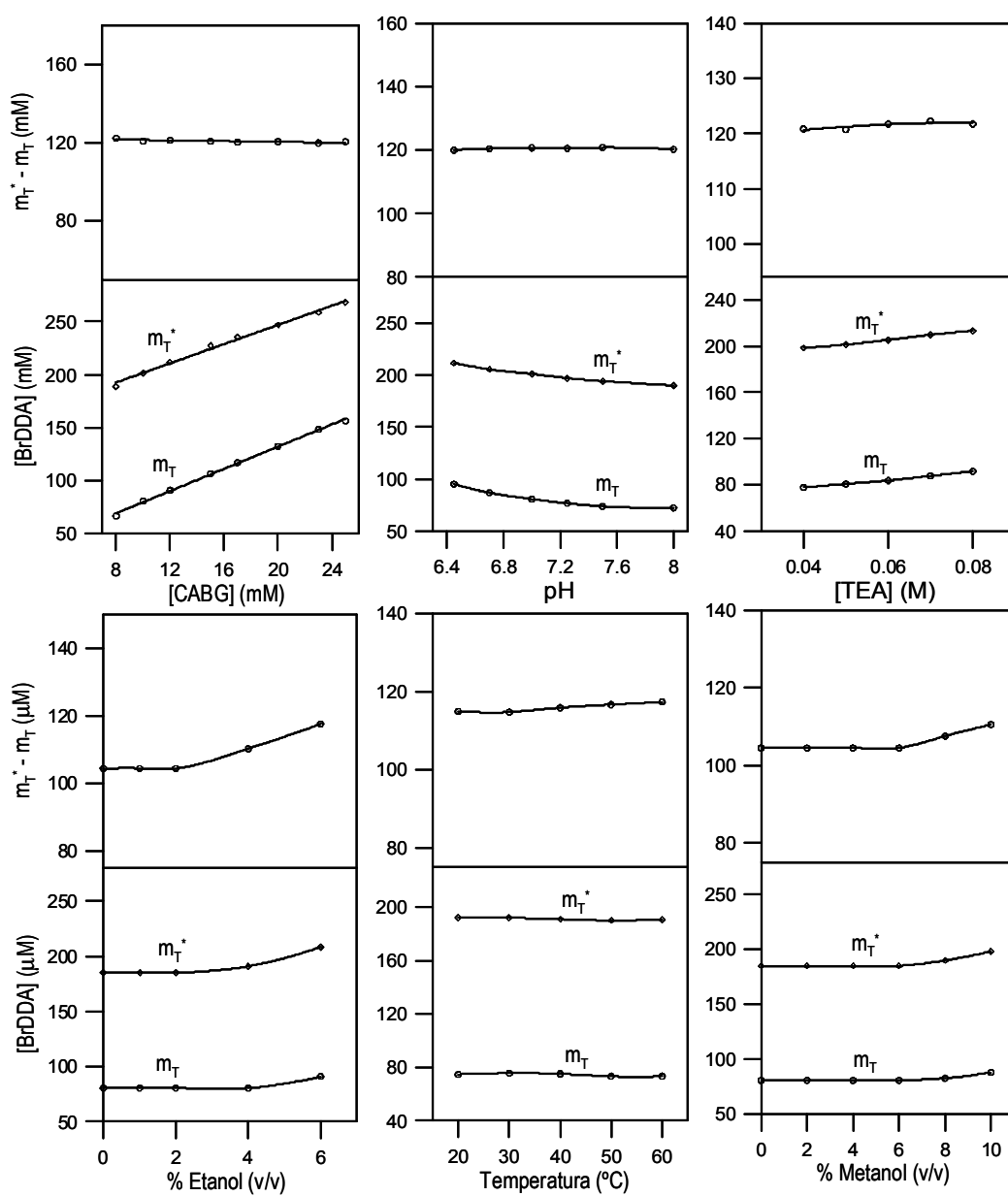


Figura 4. Variación de m_T^+ , m_T y el parámetro de medida en función de diferentes variables para el sistema químico constituido por el colorante Coomassie azul brillante G (CABG), el tensioactivo reactivo bromuro de didodecildimetilamonio (BrDDA) y el antibiótico fusidato sódico.

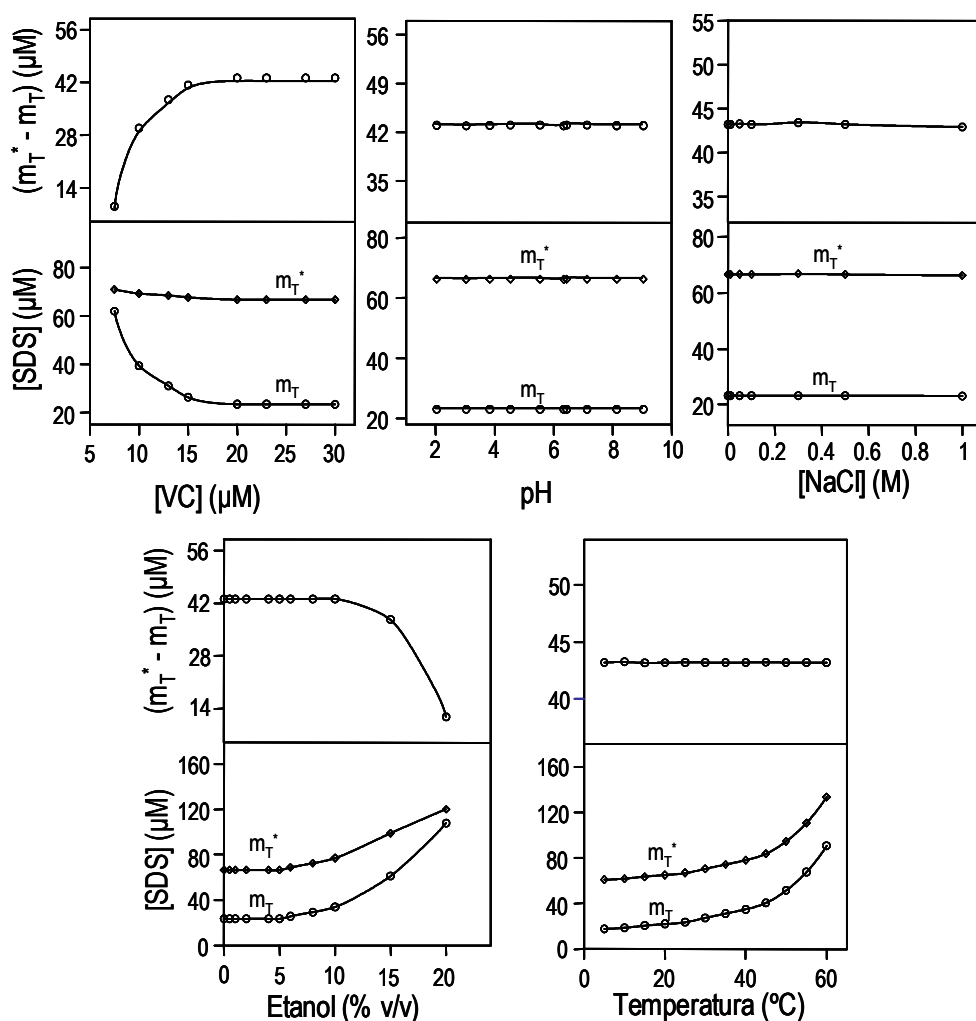


Figura 5. Variación de los parámetros m_T^+ , m_T y el parámetro de medida en función de diferentes variables para el sistema químico constituido por el colorante violeta de cresilo (VC), el tensioactivo reactivo dodecilsulfato sódico (SDS) y el tensioactivo catiónico cloruro de cetilconio.

En principio cabe esperar que la concentración de tensioactivo requerida para la formación de agregados tensioactivo-colorante aumente a medida que lo hace la concentración de colorante. De hecho este es el comportamiento observado para el sistema químico formado por el colorante CABG, el tensioactivo reactivo BrDDA y los antibióticos del grupo de los fusidanos (Figura 4). En este caso, la sensibilidad obtenida es independiente de la concentración de colorante. Sin embargo, en determinados sistemas se producen fenómenos adicionales que pueden variar este tipo de dependencia. Este es el caso del sistema constituido por el VC y el tensioactivo SDS

(Figura 5), en el que el valor de m_T disminuye inicialmente hasta que se estabiliza para una concentración de colorante de 20 μM . Para explicar este comportamiento debemos considerar que el parámetro m_T es la concentración de SDS requerido para alcanzar un determinado grado de enlace y corresponde a la suma de la concentración de tensioactivo reactivo que se encuentra formando parte del agregado mixto SDS-VC y la concentración del mismo que se encuentra en forma monomérica:

$$m_T = [\text{SDS} - \text{VC}] + [\text{SDS}]_{\text{monomérico}}$$

Al aumentar la concentración de colorante, aumenta la concentración de los agregados SDS-VC, sin embargo la de $\text{SDS}_{\text{monomérico}}$ disminuye debido a que la concentración micelar crítica del tensioactivo disminuye en presencia del colorante siendo dicha disminución más acusada a medida que aumenta la concentración de VC. La disminución de la concentración de $\text{SDS}_{\text{monomérico}}$ es comparativamente más importante que el aumento de la concentración de SDS en el agregado mixto, y por lo tanto, el parámetro m_T disminuye. La disminución de la concentración de tensioactivo requerida para formar agregados mixtos en presencia de analito, m_T^* , en función de la concentración de colorante es menos acusada que la observada en su ausencia, produciéndose un aumento de la sensibilidad obtenida.

El intervalo de pH al que se obtiene la máxima sensibilidad para la determinación de compuestos ionizables viene determinado por los valores de las constantes de acidez de dichos compuestos, ya que las condiciones más favorables para la formación de agregados mixtos tensioactivo reactivo-analito son aquellas en las que el analito tiene carga opuesta a la del tensioactivo reactivo. El valor de pK_a del ácido fusídico es 3,8 y, por lo tanto, la sensibilidad obtenida se mantiene constante en todo el intervalo de pH estudiado (6,5-8,0; Figura 4). El pH no influyó en la sensibilidad obtenida para la determinación de tensioactivos catiónicos (Figura 5), ya que la carga de estos analitos no varía con el pH.

Con respecto a la fuerza iónica, en general, un aumento de la misma origina una disminución de las interacciones electrostáticas entre moléculas tanto en el agregado mixto tensioactivo-colorante como en el agregado tensioactivo-droga. Dependiendo de a cual de los dos agregados mixtos afecte más este efecto se producirá un aumento de la señal medida, una disminución o, en el caso de que afecte a ambos de una forma similar, la señal se mantendrá constante. Así, en el sistema químico formado por el colorante

CABG y el tensioactivo BrDDA (Figura 4), concentraciones de cloruro sódico de hasta 0,08 M aumentan el parámetro de medida debido a que la formación de los agregados tensioactivo-colorante se desfavorece en mayor proporción que la formación de agregados tensioactivo-droga; mientras que concentraciones de cloruro sódico entre 0,08-0,1 M no afectan al parámetro de medida, indicando que ambos agregados se comportan de manera similar. En el caso del sistema químico formado por el colorante VC y el tensioactivo SDS (Figura 5), la adición de cloruro sódico al vaso de valoración a concentraciones comprendidas entre 0 y 1 M no afecta a ninguno de los parámetros medidos, lo que da idea de la elevada energía de las interacciones que se producen entre moléculas de tensioactivo reactivo y colorante y de tensioactivo reactivo y analito en los agregados mixtos.

La temperatura apenas afecta a la formación de los agregados a valores cercanos a la temperatura ambiente (ej. 20-35° C), sin embargo a valores mayores la influencia de esta variable depende en gran medida de los agregados implicados (comparar las Figuras 4 y 5). En cualquier caso, la sensibilidad obtenida es independiente de la temperatura en los intervalos de esta variable estudiados.

Los disolventes orgánicos se usan para disolver las formulaciones farmacéuticas o son componentes de las mismas, y por tanto su efecto sobre los agregados debe estudiarse. En los sistemas químicos estudiados se investigó el efecto de etanol y metanol. Porcentajes de disolventes inferiores a valores entre el 6% y el 10% (Figuras 4 y 5) no afectan al parámetro de medida, y por tanto, las formulaciones farmacéuticas pueden disolverse de la forma habitual.

2.3. Factores que afectan a la precisión del método

Las variables experimentales que más afectan a la precisión del método son la concentración de colorante y el pH. De acuerdo con los estudios realizados en esta Tesis Doctoral y otras investigaciones previas, la concentración de colorante mínima necesaria para obtener curvas de valoración que permitan una determinación precisa del punto final es de aproximadamente 10 μ M.

En lo que se refiere al valor de pH, el intervalo de trabajo depende de la influencia que esta variable ejerza en las características espectrales de cada colorante, lo que repercute en la forma de las curvas de valoración obtenidas y, por lo tanto, en la

precisión con la que se determina el punto final. En el caso del CABG y el VC, los intervalos de pH de trabajo a los que se obtuvieron medidas precisas del punto final fueron 6,5-8,0 y 2,0-9,0, respectivamente.

2.4. Aplicabilidad al control de calidad de fármacos

Las aplicaciones desarrolladas en esta Memoria han demostrado que, utilizando el sistema químico adecuado, el método de grado de enlace tensioactivo-colorante es aplicable a la determinación de drogas terapéuticas de diferente naturaleza y con distinta estructura química. Por primera vez, este método se ha aplicado a la determinación de principios activos catiónicos. Al igual que en investigaciones previas, los límites de detección alcanzados (Tabla 1) permiten el control de calidad de fármacos utilizando pequeñas cantidades de muestra y, además, la selectividad del método frente a sustancias no anfífilas, permite la determinación del principio activo utilizando un mínimo tratamiento de muestra que generalmente consiste en la dilución de las muestras líquidas y la puesta en disolución de cremas, polvos, pomadas y comprimidos.

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de diferentes antibióticos, antisépticos y contraceptivos en fármacos. En total se determinaron 5 principios activos en 14 especialidades farmacéuticas. En todos los casos existió concordancia entre la concentración encontrada y la concentración nominal facilitada por el productor. Las desviaciones estándar relativas obtenidas aplicando el procedimiento analítico completo fueron en todos los casos inferiores al 4 %.

Los resultados obtenidos en esta Memoria, junto con los previamente hallados por nuestro grupo, demuestran que el método es ampliamente aplicable al control de calidad de fármacos utilizando el sistema tensioactivo-colorante adecuado; BrDDA-CABG para la determinación de drogas terapéuticas aniónicas y neutras y SDS-VC para la determinación de principios catiónicos, tales como cloruros de alquildimetilbencilamonio, bromuros de alquiltrimetilamonio y cloruros de alquilpiridinio. Dada la simplicidad de la técnica y su bajo coste, el método de grado de enlace tensioactivo-colorante se considera una alternativa ventajosa frente al uso de cromatografía de líquidos, ampliamente utilizada en este contexto.

Tabla 1. Características analíticas para la determinación de drogas anifilicas usadas como antibióticos, antisépticos y contraceptivos.

Droga	Límite de detección mg L⁻¹	Intervalo de linealidad mg L⁻¹	Ordenada ± s µM	Pendiente ± s µM L mg⁻¹	r	S_{yx}
ANTIBIÓTICOS						
Ácido fusídico	0,6	1,9-70	3,0±4,0	5,9±0,1	0,998	0,94
ANTISÉPTICOS Y CONTRACEPTIVOS						
Cloruro de dodecilbenzalconio	0,8	2,7-80	0,4±1,9	2,18±0,05	0,997	5,0
Cloruro de cetalconio	0,8	2,7-50	0,6±1,7	2,13±0,07	0,996	3,9
Cloruro de bencetonio	1,0	3,2-80	-3,0±3,0	1,79±0,06	0,996	6,4
Cloruro de metilbencetonio	1,0	3,2-80	-2,6±2,7	1,78±0,03	0,998	3,4
Cloruro de benzalconio	0,8	2,7-80	0,8±1,6	2,17±0,04	0,998	3,5
Bromuro de cetrimonio	0,7	2,4-50	0,7±0,6	2,49±0,02	0,9997	1,2
Cetrimida	0,6	2,0-50	2,1±2,0	2,93±0,03	0,9996	1,7
Cloruro de cetilpiridinio	0,7	2,4-50	-1,1±1,0	2,36±0,03	0,9994	1,7

Tabla 2. Determinación de drogas antifúngicas en fármacos

Droga	Nombre comercial	Valor nominal	Valor encontrado	DER (%) (n =6)
Fusidato sódico	Fucidine (comprimidos)	477 mg g ⁻¹	477 (7) mg g ⁻¹	1,5
	Fucidine (pomada)	20 mg g ⁻¹	19,8 (0,4) mg g ⁻¹	2,0
Ácido fusídico	Fucidine (crema)	20 mg g ⁻¹	20,6 (0,8) mg g ⁻¹	3,9
	Fucidine H (crema)	20 mg g ⁻¹	20,1 (0,6) mg g ⁻¹	3,0
	Fucibet (crema)	20 mg g ⁻¹	20,2 (0,7) mg g ⁻¹	3,5
Cloruro de benzalconio	Ginejuvent (solución líquida)	10 g L ⁻¹	9,92 (0,08) g L ⁻¹	0,8
	Crema Contraceptiva Lanzas (crema)	12 mg g ⁻¹	11,8 (0,2) mg g ⁻¹	1,7
	Alcohol Reforzado JVF (solución líquida)	1 g L ⁻¹	1,005 (0,009) g L ⁻¹	0,9
	Lindemil (solución líquida)	6 g L ⁻¹	5,95 (0,08) g L ⁻¹	1,3
	Resorborina (solución líquida)	1 g L ⁻¹	0,99 (0,01) g L ⁻¹	1,0
Cloruro de cetilpiridinio	Alcohol 70° (solución líquida)	0,5 g L ⁻¹	0,500 (0,008) g L ⁻¹	1,6
	Alcohol 96° Cuve (solución líquida)	1 g L ⁻¹	1,00 (0,01) g L ⁻¹	1,0
	Silidermil (polvo)	5 mg g ⁻¹	4,99 (0,06) mg g ⁻¹	1,2
Cloruro de bencetonio	Isdinex (polvo)	0,6 mg g ⁻¹	0,605 (0,007) mg g ⁻¹	1,2

3. Sistemas supramoleculares para la extracción/preconcentración de residuos de drogas terapéuticas en alimentos y medioambiente.

El tratamiento de la muestra es la etapa más crítica del proceso analítico porque implica múltiples operaciones que requieren gran participación humana, son lentas, y constituyen una fuente potencial de errores debido a que las matrices a tratar son complejas, hay una gran variedad de contaminantes y los analitos de interés suelen hallarse a bajas concentraciones. Consecuentemente, en la actualidad se tiende a la simplificación de los procesos de extracción con objeto de aumentar la capacidad de procesamiento de muestras, mejorar la calidad de los resultados y disminuir el consumo de disolventes.

Las estrategias seguidas en esta Tesis para la simplificación de la etapa de tratamiento de la muestra se basan en el uso de sistemas supramoleculares constituidos por agregados moleculares de tensioactivo. Estos sistemas pueden establecer diferentes tipos de interacciones con los analitos/matriz de la muestra, y actuar como multiligando, obteniéndose elevados rendimientos de extracción, debido a la gran cantidad de tensioactivo existente en los agregados por unidad de masa o de volumen. Además, los agregados moleculares presentan ciertas características relevantes desde el punto de vista operacional, como son: se generan mediante fenómenos de autoensamblaje al alcance de cualquier laboratorio; están constituidos por moléculas anfífilas que son ubicuas en la naturaleza y en las síntesis químicas, además de ser generalmente biodegradables, de bajo coste y permitir la síntesis de agregados a la carta; presentan baja volatilidad e inflamabilidad; son compatibles con los sistemas de separación y detección usados en los procesos analíticos; y estabilizan los compuestos solubilizados, permitiendo integrar la recogida de muestra, transporte, conservación, extracción y concentración de contaminantes en el medio ambiente.

En esta Tesis se han desarrollado metodologías innovadoras para la extracción preconcentración de residuos de drogas terapéuticas en alimentos y medioambiente utilizando dos sistemas supramoleculares previamente desarrollados por nuestro grupo de investigación: a) disolventes supramoleculares constituidos por micelas inversas de ácido decanoico para la extracción de quinolonas y sulfonamidas en pescados y carnes y b) hemimicelas/admicelas de dodecilsulfato sódico para la extracción en fase sólida de antiinflamatorios en muestras acuosas ambientales.

A continuación se presentan los principales resultados obtenidos y se discuten los aspectos más relevantes de los mismos.

3.1. Determinación de residuos de drogas de uso veterinario en alimentos mediante extracción en un disolvente supramolecular y cuantificación mediante CL/FL.

Se han propuesto dos métodos para la microextracción de dos grupos de antibióticos de uso veterinario: quinolonas, ampliamente usadas como agentes antimicrobianos en piscifactorías; y sulfonamidas de uso frecuente en la producción ganadera. Los métodos se basan en la extracción de los antibióticos en un pequeño volumen del disolvente supramolecular constituido por micelas inversas de ácido decanoico dispersas en tetrahidrofurano (THF)-agua. En la Figura 6 se resume el procedimiento operacional utilizado, para a continuación discutir aspectos teóricos y prácticos relativos a este procedimiento.

3.1.1. Muestras

En la producción de animales de consumo humano se utiliza una gran variedad de fármacos con fines terapéuticos, profilácticos o como promotores del crecimiento. La administración de fármacos es en muchos casos necesaria, pero cuando se utilizan de forma fraudulenta, sin atender a los principios de buena práctica veterinaria, pueden quedar residuos en los alimentos con el consecuente riesgo para la salud humana. Por este motivo, la Unión Europea ha elaborado leyes que regulan de forma estricta el uso de medicamentos veterinarios en alimentos y ha establecido límites máximos permitidos de residuos (LMR) de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal. Los LMR establecidos para el ácido oxolínico y la flumequina en muestras de pescado (músculo y piel en proporciones normales) es de 100 y 600 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, respectivamente. Mientras que el LMR establecido para la suma de todas las sulfonamidas presentes en muestras de carne (músculo) es de 100 $\mu\text{g Kg}^{-1}$.

El contenido de proteínas y grasas de las muestras analizadas se recogen en la Tabla 3. Estos componentes originan importantes interferencias en la mayoría de los procedimientos que se han descrito hasta la fecha. Por esta razón, para la optimización de las variables en los procedimientos analíticos desarrollados para la extracción de quinolonas y sulfonamidas, se seleccionaron salmón y cerdo como muestras modelo, respectivamente, ya que poseen un contenido de proteínas y grasas elevado. Las drogas

veterinarias estudiadas interaccionan con la matriz de las muestras investigadas a través de enlaces de hidrógeno entre los grupos polares de las drogas (grupos carboxílicos y grupos amino) y los grupos amida de las proteínas del pescado o carne.

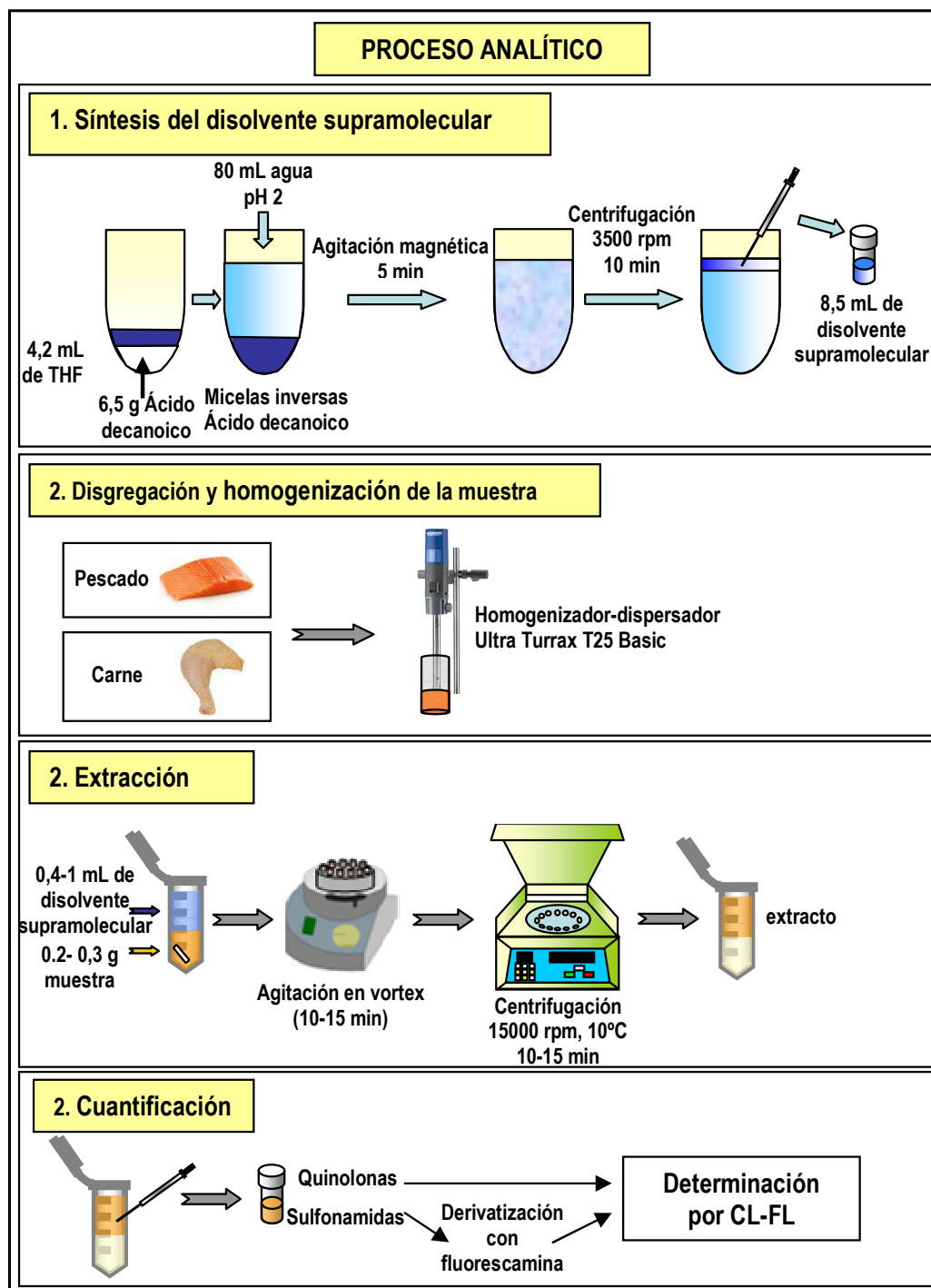


Figura 6. Procedimiento operacional propuesto para la determinación de quinolonas y sulfonamidas en muestras de pescado y carne, respectivamente.

Tabla 3. Contenido de proteínas y grasas de los productos de piscifactoria y de las carnes analizadas

ALIMENTO (100 g)	PROTEÍNAS (g)	GRASAS (g)
Salmón	19,9	3,4
Trucha asalmonada	16,7	3,6
Lubina	23,8	2,6
Dorada	17,0	2,7
Gallo	15,8	1,9
Langostinos	21,0	1,3
Cerdo	16,9	21,2
Tenera	18,6	15,0
Pollo	17,4	8,1
Pavo	21,8	2,9
Cordero	16,6	23,4

3.1.2. Extracción

La extracción de muestras sólidas con disolvente supramolecular se ha realizado tradicionalmente utilizando un sistema de dos fases líquidas constituidas por el disolvente supramolecular y la disolución acuosa en equilibrio con el mismo. Este procedimiento presenta ventajas para la extracción de compuestos hidrófobos ya que la fase acuosa intermedia situada entre la muestra sólida y el disolvente supramolecular actúa como un sistema de retención de compuestos polares de la matriz, realizando una etapa simultánea de clean-up.

Cuando los contaminantes de interés son de naturaleza polar, como es el caso de las quinolonas y las sulfonamidas, esta forma tradicional de operar no es adecuada debido a que se producen pérdidas de los analitos en la fase acuosa. Por esta razón, en las investigaciones presentadas en esta Memoria se propone por primera vez la extracción directa de la muestra con el disolvente supramolecular.

Para ello, en una primera etapa, se llevó a cabo la síntesis del disolvente supramolecular siguiendo el procedimiento descrito en la Figura 6. Se disuelve el ácido decanoico en tetrahidrofurano obteniéndose una disolución de micelas inversas. A continuación se adiciona una disolución acuosa a pH 2 y la mezcla se agita durante 5 min usando un agitador magnético. En este tiempo se forma el disolvente supramolecular en

el seno de la disolución agua-tetrahidrofurano. Para acelerar la separación del disolvente, la mezcla se centrifugó durante 10 min. El disolvente supramolecular situado en la parte superior, se recogió con una jeringa y se guardó en un vial herméticamente cerrado a 4°C hasta su uso. El volumen de disolvente supramolecular obtenido siguiendo este procedimiento es de aproximadamente 8,5 mL, suficiente para tratar entre 10 y 20 muestras dependiendo de los analitos y tipos de muestras a tratar.

La extracción de los contaminantes se realizó poniendo en contacto la muestra (0,2-0,3 g) con el disolvente supramolecular (0,4-1 mL).

La solubilización de quinolonas y sulfonamidas en el disolvente está muy favorecida debido a que se establece un mecanismo mixto de interacción: de van der Waals entre la cadena hidrocarbonada de los monómeros de ácido decanoico que forman las micelas inversas y la región hidrófoba de las drogas, y formación de puentes de hidrógeno entre los grupos polares del ácido decanoico y los grupos polares del analito. Por otro lado, el disolvente posee un elevado número de centros de solubilización. Consecuentemente, las recuperaciones obtenidas tras el procedimiento de extracción son cuantitativas para todas las drogas estudiadas.

Un aspecto importante es el comportamiento de proteínas y grasas durante el proceso de extracción. En estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación sobre la aplicación del disolvente supramolecular de micelas inversas de ácido decanoico a la extracción de contaminantes en alimentos [1,2] se comprobó que las proteínas coagulan y se separan fácilmente por centrifugación, mientras las grasas pueden incorporarse al disolvente supramolecular formando agregados mixtos con el ácido decanoico. Dada la gran concentración de ácido decanoico, en comparación a la cantidad de lípidos presentes en 0,2-0,3 g de muestra, esta incorporación no origina un cambio apreciable del volumen del disolvente supramolecular.

En la optimización del procedimiento de extracción de los residuos de fármacos se consideraron las siguientes variables: (a) la composición del disolvente supramolecular, (b) el volumen del disolvente supramolecular y (c) los parámetros operacionales relativos a la extracción y centrifugación. El objetivo de la optimización fue conseguir un tratamiento de muestra simple y rápido con recuperaciones cuantitativas y límites de cuantificación por debajo de los límites máximos de residuos establecidos.

(a) *Estudio de la influencia de la composición del disolvente supramolecular.* El disolvente supramolecular se forma en un amplio intervalo de concentraciones relativas de ácido decanoico-agua-tetrahidrofurano. La composición del disolvente no varía con la concentración de ácido decanoico utilizado en su síntesis al menos hasta una concentración del 8%, pero si presenta una importante dependencia con las proporciones relativas de agua a THF usadas para su producción. La concentración de ácido decanoico disminuye desde $0,76 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$ hasta $0,21 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$ cuando el porcentaje de THF usado en su síntesis aumenta desde el 5 al 30%. La composición del disolvente supramolecular no influyó en la recuperación obtenida para las sulfonamidas, sin embargo en el caso de las quinolonas se produjo una ligera disminución del porcentaje de extracción cuando se utilizaron disolventes supramoleculares con un menor contenido de tensioactivo. En cualquier caso, la concentración de THF recomendada para la síntesis del disolvente supramolecular es del 5%, ya que en estas condiciones, la extracción de todos los antibióticos ensayados es cuantitativa y a mayores porcentajes de THF, aumenta la cantidad de componentes de la matriz de la muestra solubilizados en el disolvente, originando interferencias en la determinación de los analitos.

(b) *Estudio de la influencia del volumen de disolvente supramolecular.* El volumen de disolvente supramolecular usado para la extracción de las drogas afecta fundamentalmente a la eficiencia de extracción. Así, la cantidad de analito extraída aumenta al aumentar el volumen de disolvente supramolecular hasta obtener recuperaciones cuantitativas y reproducibles a volúmenes iguales o superiores a $400 \mu\text{L}$ y 1 mL para quinolonas y sulfonamidas, respectivamente. Estos valores se seleccionaron como óptimos ya que nos permiten obtener una buena precisión y límites de cuantificación muy por debajo de lo establecido en la legislación para estas drogas veterinarias. A continuación, se estudió como afectaba la cantidad de muestra a la recuperación obtenida para los analitos usando el volumen de disolvente supramolecular óptimo. Al aumentar la cantidad de muestra, las recuperaciones se mantuvieron en porcentajes próximos al 100% hasta que el volumen de disolvente supramolecular no fue capaz de solvatar adecuadamente a la muestra, y por consiguiente, las recuperaciones disminuyeron.

(c) *Influencia de los parámetros operacionales.* Los parámetros operacionales se optimizaron con el fin de minimizar el tiempo requerido para alcanzar las condiciones óptimas de extracción y asegurar una completa separación del extracto obtenido de los componentes insolubles de la matriz de la muestra. Los parámetros estudiados fueron el

tiempo de extracción y velocidad de agitación en el vortex y el tiempo y velocidad de centrifugación. Los valores óptimos seleccionados para quinolonas y sulfonamidas en productos de piscifactoría y carnes, respectivamente, se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Valores de los parámetros operacionales seleccionados como óptimos

Parámetros operacionales estudiados	Quinolonas	Sulfonamidas
Tiempo de extracción (min)	15	30
Velocidad de agitación en vortex (rpm)	2500	2500
Tiempo de centrifugación (min)	15	10
Velocidad de centrifugación (rpm)	15000	15000

Los métodos de microextracción desarrollados se aplicaron al análisis de muestras reales de productos de origen animal. Los antibióticos se extrajeron en el disolvente supramolecular y posteriormente se determinaron mediante cromatografía líquida con detección fluorimétrica. En el caso de las sulfonamidas, fue necesario llevar a cabo una reacción de derivatización con fluorescamina previa a su determinación fluorescente, que fue optimizada con el objetivo de obtener máxima sensibilidad y límites de cuantificación bajos. Las variables experimentales que afectan al rendimiento de la reacción de derivatización estudiadas fueron: la concentración de reactivo derivatizador (fluorescamina) y tiempo de reacción. Se seleccionaron como valores óptimos una concentración de 1,5% (p/v) de fluorescamina y un tiempo de reacción de 70 min ya que la intensidad de fluorescencia obtenida era máxima y no existía diferencia entre la intensidad de fluorescencia en ausencia y presencia de la matriz de la muestra.

3.1.3. Cuantificación

La cuantificación de las drogas veterinarias estudiadas es posible gracias a la compatibilidad del disolvente supramolecular con la determinación mediante cromatografía líquida con detección fluorimétrica; y a la obtención de cromatogramas libres de interferentes (Figura 7).

El procedimiento analítico de los métodos desarrollados se ha evaluado de acuerdo a las directrices establecidas por Europa (2002/657/CE) para la evaluación de los métodos analíticos usados para la identificación y cuantificación de residuos de drogas veterinarias en productos de origen animal.

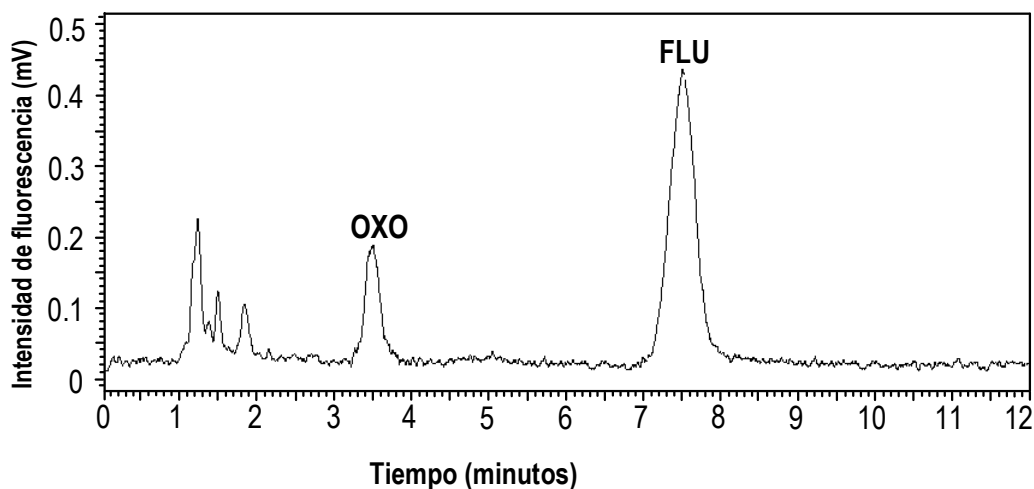


Figura 7. Cromatograma obtenido a partir de una muestra de salmón fortificada con $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de ácido oxolínico (OXO) y $600 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de flumequina (FLU).

1. Sensibilidad y linealidad. La sensibilidad de los métodos desarrollados se expresó como la pendiente de la recta de calibrado; y el intervalo de linealidad se confirmó mediante la inspección visual de los residuales. En la Tabla 5 se muestran los parámetros de las rectas de calibrado obtenidos y los límites de detección y cuantificación obtenidos en los métodos analíticos desarrollados para la determinación de quinolonas y sulfonamidas. Como puede observarse, los límites de cuantificación se encuentran en todos los casos por debajo de los límites de residuos permitidos para estos antibióticos en las muestras analizadas, por lo que los métodos propuestos son adecuados para el control de calidad de productos cárnicos y de piscifactoría.

2. Selectividad. La posible interferencia de los componentes de la matriz de la muestra se evaluó mediante el análisis de seis muestras blanco de cada una de las muestras analizadas, comprobándose que no existe ningún pico en la región de interés en la que cabe esperar la elución del analito, tanto para el caso de las quinolonas como de las sulfonamidas. Además, en el caso de las quinolonas, se seleccionó una gama de compuestos químicamente relacionados que pueden encontrarse en las muestras junto con los compuestos de interés [otras quinolonas como el ácido nalidíxico, la sarafloxacin y la enrofloxacin; y otras sustancias fluorescentes usadas también como antimicrobianos en acuicultura tales como tetraciclina (clortetraciclina y oxitetraciclina) y fenicoles (clorfenicol)], y se estudió las posibles interferencias de las mismas en la identificación y cuantificación del ácido oxolínico y la flumequina mediante el análisis de

muestras blanco de salmón, fortificadas con 1600 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de interferente. En ninguno de los casos se observaron interferencias, ya que los interferentes estudiados no dan señal a la longitud de onda de excitación y emisión usadas, y sólo el ácido nalidíxico produce un pico separado 1,8 y 2,3 min de los picos correspondientes al ácido oxolínico y la flumequina, respectivamente.

Tabla 5. Características analíticas de los métodos desarrollados

Droga	Parámetros de las rectas de calibrado			LOD ^a ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	LOQ ^a ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)
	Intervalo linealidad (ng)	Pendiente \pm s (pg^{-1})	r^b		
Ácido oxolínico	0,1-20	1,40 \pm 0,03	0,9993	6,6 ^c	22 ^c
Flumequina	0,06-20	1,61 \pm 0,01	0,99990	4,5 ^c	15 ^c
Sulfadiazina	0,08-15	6,83 \pm 0,03	0,99997	3,9 ^d	13 ^d
Sulfamerazina	0,09-15	5,61 \pm 0,06	0,9998	4,2 ^d	14 ^d
Sulfametoxipiridazina	0,19-15	2,83 \pm 0,01	0,99997	9,0 ^d	30 ^d
Sulfacoloropiridazina	0,15-15	3,48 \pm 0,05	0,9995	7,2 ^d	24 ^d
Sulfadoxina	0,09-15	5,93 \pm 0,06	0,9998	4,2 ^d	14 ^d
Sulfametoxazol	0,08-15	6,31 \pm 0,07	0,9998	3,9 ^d	13 ^d
Sulfadimetoxina	0,10-15	5,13 \pm 0,05	0,9998	4,8 ^d	16 ^d
Sulfaquinoxalina	0,25-15	2,09 \pm 0,02	0,9998	12,0 ^d	40 ^d

^aLímite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) calculados aplicando el proceso analítico completo

^bCoefficiente de correlación

^c Salmón

^d Cerdo

3. *Precisión.* La precisión de los métodos se evaluó mediante la aplicación del procedimiento analítico completo al análisis de 11 muestras de salmón y cerdo fortificadas con 200 y 100 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de quinolonas y sulfonamidas, respectivamente. La repetitividad, expresada como desviación estándar relativa, osciló entre el 2,3 y el 3,6% para las quinolonas y entre el 1,8 y el 3,6% para las sulfonamidas. También se determinó la precisión en términos de reproducibilidad para el método desarrollado para la cuantificación de sulfonamidas. Se analizaron 30 muestras de cerdo fortificadas con 100 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de los analitos en cinco días diferentes (seis muestras cada día), obteniéndose desviaciones estándares relativas en el intervalo 3,3-6,1%.

4. *Veracidad*. En el caso de las quinolonas, este parámetro se evaluó mediante el análisis de un material de referencia certificado (CRM, BCR[®]-725), que consiste en una muestra de salmón liofilizada con un contenido certificado de ácido oxolínico y flumequina de 600 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ (incertidumbre = 100 $\mu\text{g Kg}^{-1}$) y 1170 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ (incertidumbre = 210 $\mu\text{g Kg}^{-1}$), respectivamente. Los resultados obtenidos, expresados como valor medio ($n = 11$) \pm incertidumbre expandida [calculada como $k \cdot s$ (siendo $k = 2$ para un nivel de significación de 0,05)], fueron $580 \pm 32 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para el ácido oxolínico y $1167 \pm 60 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para la flumequina. Así, la veracidad expresada como porcentaje, y calculada como la diferencia entre la concentración media determinada y la concentración certificada dividida entre el valor certificado, fue de -3,3% para el ácido oxolínico y -0,3% para la flumequina. Estos porcentajes están dentro del intervalo de veracidad establecido para métodos cuantitativos en la Decisión de la Comisión 2002/657/CE (-20-10% para concentraciones iguales o superiores a 10 $\mu\text{g Kg}^{-1}$).

Al no disponerse de materiales de referencia de carne con concentraciones certificadas de sulfonamidas, la veracidad del método desarrollado para la determinación de estos contaminantes se evaluó mediante el análisis de una muestra de cerdo fortificada con 100 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de cada analito. Las concentraciones medias obtenidas ($n = 11$) y sus correspondientes valores de incertidumbre ($\alpha = 0,05$) fueron 100 ± 7 , 102 ± 6 , 102 ± 8 , 100 ± 5 , 100 ± 5 , 100 ± 6 , 101 ± 6 y $101 \pm 6 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para sulfadiazina, sulfamerazina, sulfametoxipiridazina, sulfacoloropiridazina, sulfadoxina, sulfametoxazol, sulfadimetoxina y sulfaquinoxalina, respectivamente. Las recuperaciones obtenidas variaron entre 100 y 102%, valores dentro de los márgenes establecidos en la Decisión de la Comisión 2002/657/CE (80-110% para concentraciones de analito superiores a 10 $\mu\text{g Kg}^{-1}$).

Finalmente la aplicabilidad de los métodos propuestos se demostró analizando muestras sin fortificar y fortificadas de diferentes tipos de pescado y marisco en el caso de las quinolonas, y de muestras de distintos tipos de carne en el caso de las sulfonamidas. En las Tablas 6 y 7 se muestran las concentraciones adicionadas y las recuperaciones obtenidas para quinolonas y sulfonamidas, respectivamente.

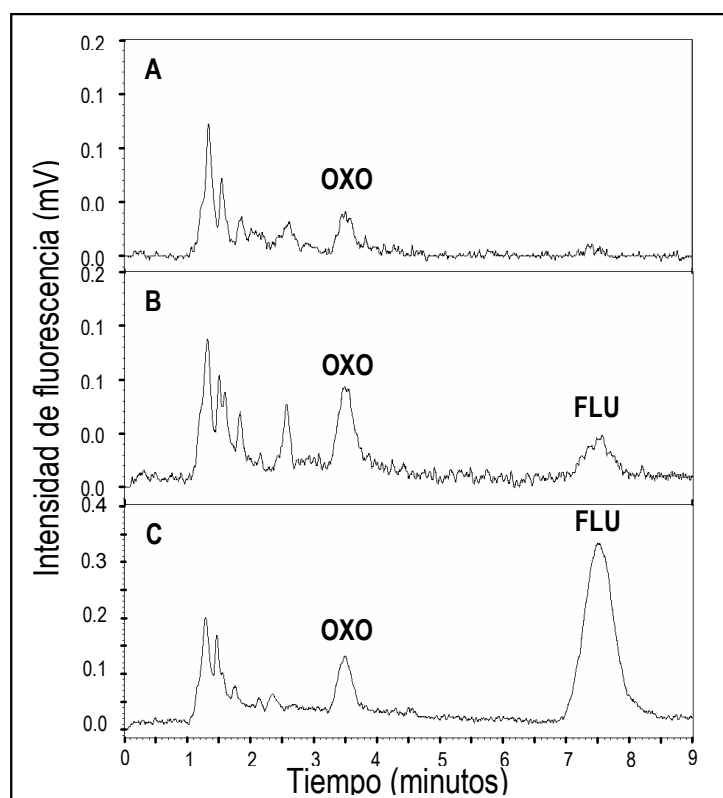
Tabla 6. Concentración adicionada de ácido oxolínico (OXO) y flumequina (FLU) y recuperación obtenida en el análisis de muestras fortificadas de pescado y marisco de piscifactoría

Muestras	Concentración adicionada ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)		Recuperación $\pm s$ (%)	
	OXO	FLU	OXO	FLU
Salmón	50	50	99,6 \pm 0,8	101 \pm 2
	100	600	100 \pm 1	99,1 \pm 0,7
Trucha	50	50	100 \pm 3	101 \pm 1
	100	600	100 \pm 1	99,5 \pm 0,6
Lubina	50	50	99 \pm 3	100 \pm 1
	100	600	100 \pm 3	101,4 \pm 0,7
Dorada	50	50	102 \pm 1	100 \pm 2
	100	600	102 \pm 2	100,8 \pm 0,2
Gallo	50	50	99 \pm 2	101 \pm 1
	100	600	103 \pm 5	101,5 \pm 0,6
Langostinos	50	50	102 \pm 5	100 \pm 3
	100	600	100 \pm 2	101,4 \pm 0,2

En las muestras analizadas no se encontraron concentraciones detectables de sulfonamidas y flumequina. Sin embargo, el ácido oxolínico se detectó en la muestra de gallo a una concentración de $37 \pm 2 \mu\text{g Kg}^{-1}$, concentración inferior al LMR establecido para este residuo, pero superior al límite de cuantificación del método. La identificación del analito se realizó mediante cocromatografía, comparando los tiempos de retención y los anchos de pico a la mitad de la altura máxima en muestras sin fortificar y fortificadas. La Figura 8 muestra los cromatogramas obtenidos para una muestra de gallo (A) sin fortificar y fortificada con (B) $50 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de ácido oxolínico (OXO) y flumequina (FLU) y con (C) $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de OXO y $600 \mu\text{g Kg}^{-1}$ FLU. La variación de los tiempos de retención obtenidos en muestras sin fortificar y fortificadas fue del 2%, porcentaje inferior al establecido en la Decisión de la Comisión 2002/657/CE (tolerancia = 5%). El ancho de pico a la mitad de la altura máxima en las muestras fortificadas fue entre el 95 y el 106% del obtenido en las muestras sin fortificadas (la Decisión de la Comisión 2002/657/CE admite variaciones dentro del intervalo 90-110%).

Tabla 7. Concentración de sulfonamidas adicionada y recuperación obtenida en el análisis de muestras de carne fortificadas

Sulfonamidas	Concentración adicionada ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Recuperación \pm s (%)				
		Cerdo	Pollo	Pavo	Cordero	Tenera
Sulfadiazina	100	101 \pm 1	100 \pm 3	99 \pm 3	99 \pm 2	102 \pm 3
	500	100 \pm 5	100 \pm 1	100 \pm 1	100 \pm 1	99 \pm 1
Sulfamerazina	100	102 \pm 1	104 \pm 2	101 \pm 2	102 \pm 2	102 \pm 3
	500	106 \pm 4	100 \pm 1	99 \pm 1	100 \pm 1	101 \pm 1
Sulfametoxipiridazina	100	102 \pm 2	104 \pm 4	107 \pm 3	102 \pm 2	104 \pm 2
	500	99 \pm 1	98 \pm 2	98 \pm 3	100 \pm 1	99 \pm 3
Sulfacloropiridazina	100	102 \pm 1	103 \pm 2	107 \pm 5	100 \pm 1	103 \pm 4
	500	103 \pm 3	109 \pm 3	107 \pm 3	100 \pm 1	101 \pm 1
Sulfadoxina	100	102 \pm 2	101 \pm 1	101 \pm 1	101 \pm 1	103 \pm 5
	500	100 \pm 2	104 \pm 2	102 \pm 1	101 \pm 1	100 \pm 1
Sulfametoxazol	100	100 \pm 1	104 \pm 1	103 \pm 2	103 \pm 1	104 \pm 1
	500	103 \pm 1	106 \pm 2	105 \pm 2	99 \pm 1	100 \pm 1
Sulfadimetoxina	100	101 \pm 1	101 \pm 1	106 \pm 5	104 \pm 3	101 \pm 1
	500	102 \pm 1	107 \pm 4	106 \pm 4	102 \pm 1	102 \pm 1
Sulfaquinoxalina	100	102 \pm 1	101 \pm 4	102 \pm 5	104 \pm 4	103 \pm 3
	500	100 \pm 2	101 \pm 1	100 \pm 1	100 \pm 2	100 \pm 1

**Figura 8.** Cromatogramas obtenidos a partir de una muestra de gallo (A) sin fortificar y (B,C) fortificada con los analitos a dos niveles de concentración: (B) 50 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de OXO y 50 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de FLU y (C) 100 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de OXO y 600 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de FLU.

5. *Robustez*. La robustez de los esquemas de extracción de antibióticos en productos de origen animal basados en el uso de disolventes supramoleculares se demostró realizando un estudio exhaustivo del efecto que variaciones de las condiciones experimentales (%THF, volumen de disolvente supramolecular, tiempo y velocidad de agitación en el vortex y tiempo y velocidad de centrifugación) de una magnitud similar a las que se pueden producir durante el trabajo rutinario en el laboratorio, tienen en la exactitud de las medidas obtenidas en el análisis de quinolonas en pescado. Los resultados obtenidos se evaluaron aplicando el procedimiento de Youden, llegando a la conclusión de que la metodología de extracción desarrollada es muy robusta.

6. *Estabilidad*. Se comprobó que las disoluciones patrón de ácido oxolínico y de flumequina que contienen 100 mg L⁻¹ de analito son estables durante un mes almacenadas a 4°C; y que las disoluciones patrón de sulfonamidas también de 100 mg L⁻¹, son estables a -20 °C, al menos durante un mes. Las disoluciones de trabajo que contiene 1,5 mg L⁻¹ de ambas quinolonas o 1,5 mg L⁻¹ de cada una de las sulfonamidas, son estables durante 12 horas a temperatura ambiente. También se estudió la estabilidad de las quinolonas en las muestras de pescado, comprobándose que no se producían cambios en la concentración de los analitos conservando las muestras a -20 °C durante un tiempo máximo de dos semanas. A tiempos mayores se produce una disminución de la concentración de ambas quinolonas. En el caso de las sulfonamidas, la concentración de los analitos también permanece estable en muestras conservadas a -20 °C durante varias semanas [3,4].

7. *Límite de decisión y capacidad de detección*. El límite de decisión (CC α) se define como el límite en el cual y a partir del cual se puede concluir con una probabilidad de error α que una muestra no es conforme. El valor de CC α se determina analizando un mínimo de 20 materiales blancos por matriz, enriquecidos con analito hasta el límite permitido. El límite de decisión es igual a la concentración en el límite permitido más 1,64 veces la desviación estándar obtenida para las 20 medidas realizadas ($\alpha = 5\%$).

La capacidad de detección es el contenido mínimo de la sustancia que puede ser detectado, identificado o cuantificado en una muestra, con una probabilidad de error de β . Se calcula analizando un mínimo de 20 materiales blancos por matriz, enriquecidos con analito hasta el límite de decisión. Así, la capacidad de detección es igual al valor del

límite de decisión más 1,64 veces la desviación estándar obtenida para las 20 medidas realizadas ($\beta = 5\%$).

En la Tabla 8 se muestran los valores del límite de decisión y capacidad de detección calculados para cada una de las quinolonas y sulfonamidas estudiadas.

Tabla 8. Límites de decisión ($CC\alpha$) y capacidad de detección ($CC\beta$) para las quinolonas y sulfonamidas estudiadas en muestras de salmón y cerdo, respectivamente.

Droga veterinaria	$CC\alpha$ ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	$CC\beta$ ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)
Ácido oxolínico	104	109
Flumequina	611	622
Sulfadiazina	106	111
Sulfamerazina	105	110
Sulfametoxipiridazina	107	113
Sulfacloropiridazina	104	109
Sulfadoxina	106	111
Sulfametoxazol	105	110
Sulfadimetoxina	105	109
Sulfaquinoxalina	105	110

3.2. Determinación de drogas terapéuticas en muestras acuosas medioambientales mediante extracción en fase sólida supramolecular y cuantificación mediante CL/FL.

Se ha desarrollado un método para la extracción en fase sólida supramolecular de ibuprofeno y naproxeno en muestras acuosas medioambientales. El adsorbente supramolecular usado está constituido por hemimicelas de dodecil sulfato sódicoformadas sobre alúmina. En la Figura 9 se muestra el procedimiento analítico llevado a cabo para realizar la extracción y a continuación se discuten los aspectos teóricos y prácticos relativos a este procedimiento.

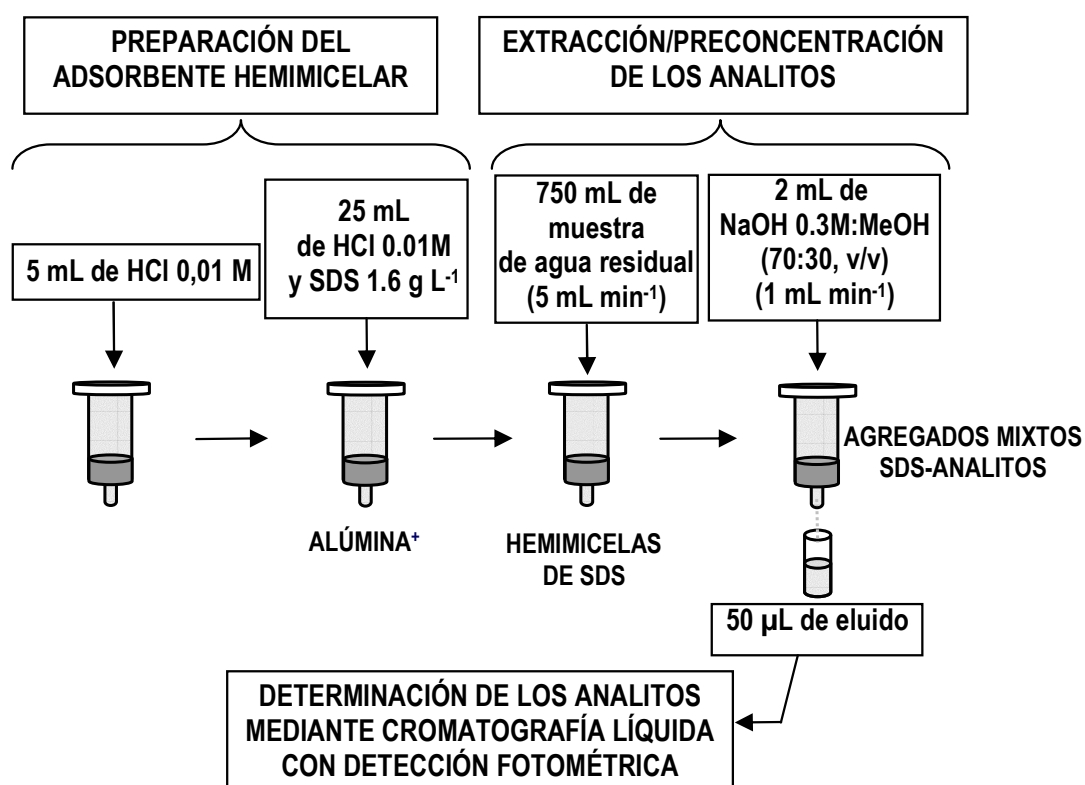
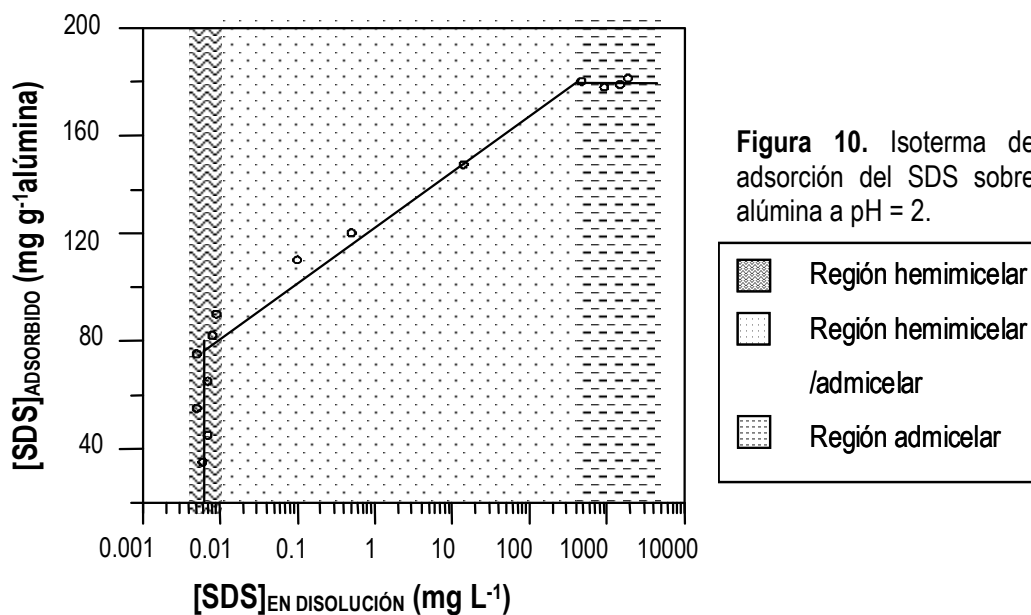


Figura 9. Procedimiento analítico para la determinación de ibuprofeno y naproxeno en aguas residuales.

3.2.1. Adsorbente

Una de las características que diferencian a las fases adsorbentes supramoleculares utilizadas en esta Memoria de las tradicionalmente usadas en SPE es la posibilidad de modificar la naturaleza del adsorbente en función de la concentración de tensioactivo utilizada para su síntesis. Y este hecho, que constituye una clara ventaja, exige conocer la superficie adsorbente que se utiliza en cada momento, con el fin de aprovechar al máximo las posibilidades del fenómeno de la adsolubilización en SPE. Por lo tanto, es fundamental disponer de la isoterma de adsorción del tensioactivo sobre el óxido mineral en las condiciones experimentales usadas en el proceso de extracción. En la Figura 10 se muestra la isoterma de adsorción de dodecilsulfato sódico (SDS) sobre alúmina a pH 2.



La adsorción de SDS sobre alúmina nos permite disponer de diferentes fases adsorbentes en función de la cantidad y tipo de tensioactivo: la región hemimicelar, la región hemimicelar/admicelar y la región admicelar.

En la región hemimicelar, antes de la completa neutralización de la carga de la alúmina por el SDS, la fase adsorbente puede retener a los solutos en base a un mecanismo mixto de adsorción; hidrófobo, mediante solubilización en las hemimicelas, e iónico, mediante interacción directa de los analitos con carga negativa con la superficie del óxido. En la región hemimicelar/admicelar y admicelar, además de las interacciones hidrófobas que se pueden establecer con las cadenas hidrocarbonadas del tensioactivo, se puede producir la solubilización de los analitos mediante diferentes mecanismos dependiendo de la naturaleza del grupo polar.

Al final de la región admicelar se alcanza la carga máxima del tensioactivo y toda la superficie de la alúmina está cubierta por admicelas. La adición de más SDS produce un incremento de su concentración en disolución, hasta alcanzar la concentración micelar crítica (cmc), y se forman micelas en disolución. Por tanto, las regiones válidas dentro de la isoterma de adsorción de SDS sobre alúmina a pH 2 para SPE son aquellas en las que existen hemimicelas y admicelas en equilibrio con monómeros en disolución, ya que

cuando se forman micelas acuosas el analito se distribuye entre éstas y las admicelas, no reteniéndose cuantitativamente los analitos en la fase adsorbente.

El parámetro con mayor influencia en la isoterma de adsorción de SDS sobre alúmina es el pH de la disolución. Esta variable determina la densidad de carga de la superficie del óxido y por tanto la cantidad total de tensioactivo adsorbido en la región hemimicelar y admicelar. Desde un punto de vista analítico nos interesa trabajar a valores de pH suficientemente alejados del punto de carga cero del óxido. La aplicación que hemos desarrollado se ha llevado a cabo a pH 2, donde la alúmina (pcz ~ 8.5) presenta una elevada densidad de carga, lo que nos permite usar elevados volúmenes de muestra antes de alcanzar el volumen de ruptura.

3.2.2. Muestras

Los antiinflamatorios no esteroideos, ibuprofeno y naproxeno, son fármacos considerados como contaminantes emergentes frecuentemente encontrados en muestras acuosas medioambientales debido a su elevado consumo, el elevado porcentaje en el que se excretan sin metabolizar y la baja capacidad de las plantas de tratamiento de aguas residuales para eliminarlos eficazmente. Las concentraciones a las que se encuentran estos contaminantes en aguas residuales son muy bajas (desde los ng L⁻¹ a pocos µg L⁻¹), por lo que los métodos analíticos utilizados para su determinación implican etapas de concentración de los analitos y eliminación de interferentes. El método desarrollado en esta Memoria se aplicó al análisis de aguas residuales, efluentes e influentes, procedentes de estaciones de depuración de aguas residuales del sur de España.

Las aguas residuales tienen una composición muy variable dependiendo de su origen, pero en general contienen materia orgánica (tensioactivos, proteínas, grasas, carbohidratos, etc.) y sales inorgánicas (carbonatos de calcio y magnesio, sales sódicas y potásicas, y diferentes minerales). Puesto que se han analizado muestras filtradas, sólo los componentes solubles de la matriz pueden interferir con la determinación de ibuprofeno y naproxeno.

Investigaciones previas llevadas a cabo por nuestro grupo de investigación [5] acerca de la influencia de los componentes de la matriz de aguas residuales (electrolitos, agentes precipitantes y materia orgánica) sobre las isotermas de adsorción de

dodecilsulfato sódico sobre alúmina (el sistema adsorbente seleccionado para la aplicación desarrollada en esta Memoria) ha concluido que:

1. El electrolito afecta a la adsorción del tensioactivo de dos formas: (a) en la región hemimicelar la adsorción del dodecilsulfato sódico disminuye por la competencia entre el electrolito y los monómeros de tensioactivo por la superficie del óxido mineral; y (b) en la región admicelar, la adsorción del tensioactivo aumenta porque el electrolito reduce las repulsiones electrostáticas entre los grupos cabeza del tensioactivo. Como consecuencia, la extracción en fase sólida está desfavorecida al principio de la región hemimicelar ya que al disminuir la cantidad de adsorbente, disminuye la retención de los analitos y el volumen de ruptura; mientras que no afecta al final de la región hemimicelar, zona generalmente recomendada para la extracción de contaminantes orgánicos con adsorbentes basados en hemimicelas.

2. Hemimicelas y hemimicelas/admicelas pueden utilizarse para la extracción en fase sólida de contaminantes orgánicos de muestras acuosas que contengan iones precipitantes porque la concentración de dodecilsulfato sódico en equilibrio con los agregados es muy baja en estas regiones. Sin embargo, para trabajar en la región admicelar, donde la concentración de tensioactivo en disolución es más alta, es necesario la eliminación de los iones precipitantes de la muestra antes de la extracción.

3. La materia orgánica disuelta, constituida principalmente por hidratos de carbono, proteínas, grasas y tensioactivos aniónicos, no afecta a las isotermas de adsorción de dodecilsulfato sódico sobre alúmina a pH 2 en ningún caso, así estos adsorbentes son adecuados para la extracción de contaminantes a partir de aguas de río y aguas residuales.

De todo lo expuesto se puede concluir que tanto el final de la región hemimicelar como la región constituida por la mezcla de hemimicelas y admicelas son las más selectivas y este criterio se ha tenido en cuenta para la selección del adsorbente en la aplicación desarrollada en esta Memoria.

3.2.3. Extracción

La capacidad de las hemimicelas/admicelas y admicelas de SDS para adsolubilizar ibuprofeno y naproxeno se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Efecto de la concentración de SDS en el porcentaje de adsolubilización

Agregados supramoleculares	Concentración de tensoactivo (mg SDS g ⁻¹ alúmina)	Porcentaje de droga adsolubilizada	
		Ibuprofeno	Naproxeno
	0	19	45
Hemimicelas	15	84	92
	50	≥99	≥99
	80	≥99	≥99
Hemimicelas/Admicelas	150	≥99	≥99
Admicelas	200	≥99	≥99

Aunque tanto las hemimicelas como las admicelas de SDS adsolubilizan cuantitativamente a las drogas terapéuticas estudiadas, se seleccionaron las hemimicelas como el adsorbente más adecuado, ya que, la concentración de SDS en la disolución en equilibrio con estos agregados es baja y no es necesario adicionar tensoactivo a las muestras. Sin embargo, cuando se utilizan hemimicelas/admicelas o admicelas como material adsorbente, la concentración de SDS en la disolución en equilibrio es elevada, siendo necesario adicionar tensoactivo a las muestras para evitar que se produzca la pérdida progresiva de SDS durante la filtración de la muestra a través del adsorbente, lo que modificaría la cantidad y/o características de la fase adsorbente.

En la región seleccionada los analitos son retenidos a través de la formación de agregados mixtos ibuprofeno-SDS y naproxeno-SDS. La capacidad de ibuprofeno y naproxeno para formar agregados mixtos con SDS al pH usado para la extracción hemimicelar se demostró utilizando el método de agregados mixtos, desarrollado por nuestro grupo de investigación para la determinación de compuestos anfifílicos [6].

La concentración micelar crítica (cmc) de un agregado mixto (C^*) puede relacionarse con la fracción molar de cada uno de los componentes (α_i), la cmc de los componentes puros (c_i) y sus coeficientes de actividad en la micela mixta (f_i) a través de la expresión:

$$\frac{1}{C^*} = \sum_{i=1}^n \frac{\alpha_i}{f_i c_i}$$

En el método de agregados mixtos esta ecuación se expresa de la siguiente forma:

$$1 - \frac{C_s^M}{C_s} = \frac{1}{f_d C_d} C_d^M$$

Donde s y d se refieren al SDS y droga, y C_d^M y C_s^M son las concentraciones de droga y tensioactivo en la disolución cuando se alcanza la cmc (C^*). Si se forman agregados mixtos, al representar $1 - C_s^M / C_s$ frente a C_d^M se debe obtener una línea recta. En la Figura 11 se muestra (A) la variación de $1 - C_s^M / C_s$ en función de la concentración de (1) naproxeno y (2) ibuprofeno, que como se puede observar, es lineal.

Con el fin de determinar la composición de los agregados mixtos en función de la concentración de droga en disolución (C_d^M) se estableció la variación de la fracción molar de droga en el agregado mixto (x_d) con la fracción molar de la droga en disolución (α_d) (Figura 11 B). Se puede observar que la fracción molar de la droga en el agregado mixto aumenta linealmente al incrementar la fracción molar de droga en disolución, siendo esta dependencia similar a la encontrada para determinadas mezclas de tensioactivos.

Como conclusión final, podemos afirmar que el ibuprofeno y el naproxeno son retenidos mediante interacciones hidrófobas con las cadenas hidrocarbonadas del SDS y formación de puentes de hidrógeno con su grupo polar, formando agregados mixtos SDS-droga y que la fuerte asociación obtenida al final de la región hemimicelar, donde existen pequeños núcleos de admicelas, debe permitir el desarrollo de un método de extracción robusto y con un alto volumen de ruptura.

Los eluyentes tradicionalmente usados para la desorción de los analitos de los adsorbentes supramoleculares son disolventes orgánicos o disoluciones acuosas a un pH adecuado, que tienen la capacidad de destruir los agregados del tensioactivo sobre el óxido mineral. En esta aplicación se investigaron los siguientes eluyentes: metanol, etanol, acetonitrilo, propanol, tetrahidrofurano, hidróxido sódico y mezclas de hidróxido

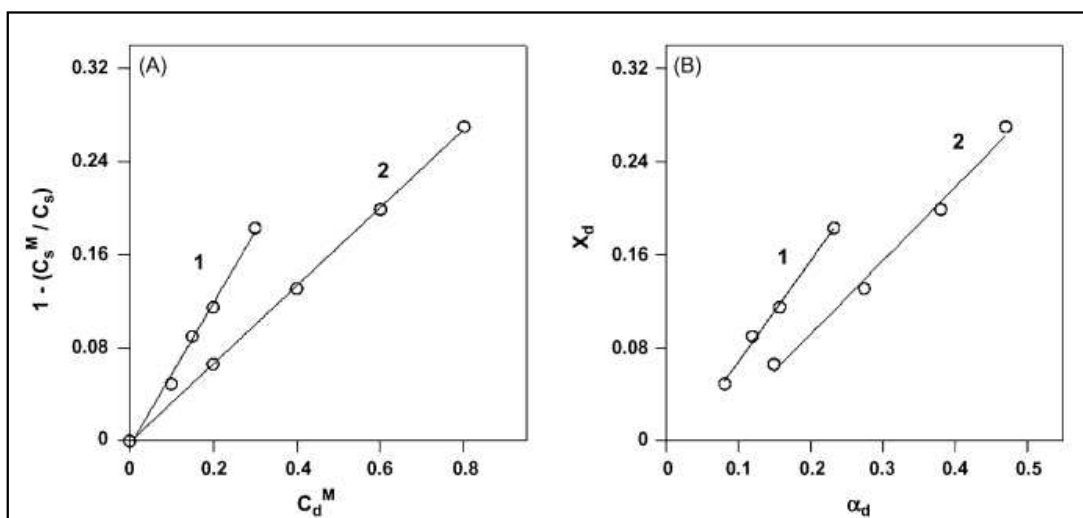


Figura 11. Variación de (A) $1 - C_s^M / C_s$ en función de la concentración de droga (C_d^M) y (B) la fracción molar de droga (x_d) en el agregado mixto con la fracción molar de la droga en disolución (α_d). (1) Naproxeno y (2) ibuprofeno.

sódico/metanol. Los disolventes orgánicos presentaron baja capacidad de elución para ibuprofeno y naproxeno (ej. $36 \pm 4\%$ y $37 \pm 4\%$, respectivamente, usando 2 mL de metanol) debido a la fuerte interacción existente entre los analitos y el SDS en los agregados mixtos. Las disoluciones básicas presentan una mayor capacidad de elución, ya que causan la ruptura de los enlaces del SDS con la alúmina (ej. $88 \pm 4\%$ y $88 \pm 3\%$ para ibuprofeno y naproxeno, respectivamente, usando 2 mL de NaOH 0,3 M), no siendo recomendable el uso de concentraciones de NaOH superiores a 0,3 M, ya que se produce una interferencia en la determinación cromatográfica de los analitos, disminuyendo las áreas de pico medidas. Usando un mínimo de 2 mL de mezcla NaOH 0,3 M:metanol, con porcentajes de disolvente orgánico en el intervalo 10-90% se obtuvieron recuperaciones cuantitativas.

La velocidad de elución también es un factor clave que se debe controlar con el fin de obtener recuperaciones cuantitativas y reproducibles. Se seleccionó una velocidad de elución de 1 mL min^{-1} como valor óptimo, ya que a flujos mayores se observa una disminución de los porcentajes de recuperación. En las condiciones de extracción especificadas, se obtienen recuperaciones cuantitativas para ibuprofeno y naproxeno hasta un volumen de muestra de 750 mL y 1 L, respectivamente. Esto implica que el

factor de preconcentración obtenido para la extracción simultánea de ambas drogas utilizando el procedimiento analítico experimental (Figura 9) es de 375.

3.2.4. Cuantificación

La cuantificación de ibuprofeno y naproxeno en el eluido se llevó a cabo mediante cromatografía líquida con detección fotométrica. En la Tabla 10 se recogen las características analíticas del método cromatográfico y los límites de detección obtenidos para la determinación de los analitos aplicando el método basado en SPE supramolecular y CL-fotometría. Se puede observar que estos límites son muy bajos por lo que el método propuesto puede ser aplicado a la determinación de ibuprofeno y naproxeno en todo el intervalo de concentraciones en el que se pueden encontrar en aguas residuales. La precisión se evaluó mediante el análisis de 11 muestras de influentes y efluentes de una planta de aguas residuales que contenían 2,4 y 0,34 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ibuprofeno y 0,93 y 0,16 $\mu\text{g L}^{-1}$ de naproxeno, respectivamente. Las desviaciones estándar relativas obtenidas fueron 1,8% y 1,6% para ibuprofeno, y 2,4% y 3,1% para naproxeno, respectivamente.

Finalmente, la aplicabilidad del método propuesto se demostró analizando muestras de influentes y efluentes de tres depuradoras andaluzas sin fortificar y fortificadas con ambos analitos (Tabla 11). Las dos drogas se detectaron en todas las muestras analizadas con concentraciones que variaron dentro de los intervalos 0,4-7,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 0,2-3,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ibuprofeno y naproxeno, respectivamente, y se obtuvieron recuperaciones cuantitativas de los analitos para todas las muestras fortificadas analizadas (93-98%), independientemente del grado de contaminación de las mismas.

Tabla 10. Características analíticas del método basado en SPE hemimicelar/LC-Fotometría

Droga	Parámetros de las rectas de calibrado obtenidos mediante CL-Fotometría				Límites de detección en aguas residuales ^a (ng L ⁻¹)	
	Intervalo linealidad (ng)	Pendiente \pm s (ng ⁻¹) x 10 ⁴	Ordenada \pm s x 10 ⁴	r ^b	Influente	Efluente
Ibuprofeno	0,2-750	1,033 \pm 0,004	-1,2 \pm 1,2	0,9997	9	7
Naproxeno	0,02-750	8,52 \pm 0,05	-1,1 \pm 2,1	0,99993	0,8	0,5

^aCalculado aplicando el proceso analítico completo a seis muestras de 750 mL de influente y efluente

^bCoefficiente de correlación

Tabla 11. Análisis de muestras de tres depuradoras de aguas residuales urbanas de Andalucía y estudios de recuperación

Muestras	Concentración adicionada ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Concentración determinada ^a \pm s ^b ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Recuperación \pm s ^b (%)	
Influyente de Linares	0	0	7,4 \pm 0,1	3,28 \pm 0,07		
	2,0	2,0	9,4 \pm 0,1	5,2 \pm 0,1	98 \pm 9	98 \pm 5
Efluente de Linares	0	0	1,36 \pm 0,03	0,161 \pm 0,005		
	0,4	0,4	1,76 \pm 0,03	0,54 \pm 0,02	101 \pm 8	95 \pm 5
Influyente de Puente Genil	0	0	2,0 \pm 0,1	0,99 \pm 0,05		
	2,0	2,0	3,88 \pm 0,05	2,85 \pm 0,02	94 \pm 6	93 \pm 3
Efluente de Puente Genil	0	0	1,293 \pm 0,009	0,82 \pm 0,04		
	0,4	0,4	1,68 \pm 0,02	1,20 \pm 0,04	97 \pm 5	96 \pm 9
Influyente de Bailén	0	0	2,41 \pm 0,02	0,931 \pm 0,003		
	2,0	2,0	4,33 \pm 0,05	2,83 \pm 0,03	96 \pm 3	95 \pm 2
Efluente de Bailén	0	0	0,369 \pm 0,009	0,160 \pm 0,005		
	0,4	0,4	0,74 \pm 0,01	0,540 \pm 0,002	94 \pm 3	98 \pm 5

^aMedia de tres determinaciones^bDesviación estándar

4. Bibliografía

- [1] A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 530.
- [2] A. García-Prieto, L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Food Addit. Contam. 26 (2009) 265.
- [3] I. Pecorelli, R. Bibi, L. Fioroni, R. Galarini, J. Chromatogr. A 1032 (2004) 23.
- [4] A. Posyniak, J. Zmudzki, K. Mitrowska, J. Chromatogr. A 1087 (2005) 259.
- [5] A. García-Prieto, L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Anal. Bioanal. Chem. 388 (2007) 1823.
- [6] E. Borrego, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Trends Anal. Chem. 20 (2001) 241.



CONCLUSIONES

Las investigaciones desarrolladas en esta Tesis Doctoral han demostrado que sistemas supramoleculares de diferente naturaleza (agregados en disolución, adsorbentes y disolventes) tienen la capacidad de interactuar fuertemente con las drogas terapéuticas, dadas las similitudes estructurales existentes entre estos compuestos y los tensioactivos que constituyen dichos sistemas. La mayoría de las drogas terapéuticas poseen carácter anfifílico y por lo tanto, generalmente, la incorporación de las moléculas de droga al sistema supramolecular se produce mediante la formación de agregados mixtos tensioactivo-droga.

Los sistemas supramoleculares constituyen una herramienta adecuada para el desarrollo de metodologías analíticas basadas en dicha capacidad de interacción para la determinación de drogas terapéuticas en diferentes ámbitos de aplicación: control de la calidad de fármacos, control de calidad de alimentos y monitorización de la contaminación ambiental (Partes I, II y III de la Memoria, respectivamente). Las principales conclusiones obtenidas sobre el uso de sistemas supramoleculares en cada uno de estos ámbitos de aplicación se resumen a continuación:

Control de calidad de fármacos (Parte I)

Los sistemas supramoleculares utilizados en este ámbito han sido agregados moleculares formados en mezclas ternarias de tensioactivo, colorante anfifílico y droga en disolución acuosa y los métodos desarrollados se han basado en la metodología de grado de enlace tensioactivo-colorante (GETC).

Las investigaciones desarrolladas han puesto de manifiesto la versatilidad de la metodología GETC en cuanto a la naturaleza de las drogas anfifílicas que es posible determinar, ampliando su campo de aplicación a la determinación de principios activos catiónicos (tensioactivos catiónicos usados como antisépticos y contraceptivos) y con estructuras esteroidales (fusidanos usados como antibióticos).

Los métodos analíticos propuestos proporcionan una sensibilidad y precisión similar o superior a los métodos convencionales y además, aventajan a éstos en:

- 1) Selectividad. Los métodos convencionales requieren realizar la separación del principio activo de la matriz de la muestra previa a su determinación, mientras que usando los métodos basados en la metodología GETC el análisis se realiza

directamente con un mínimo tratamiento de muestra que consiste en la dilución de las muestras líquidas y la disolución de las muestras sólidas.

- 2) Rapidez, tanto en la etapa de tratamiento de muestra como de determinación de los analitos.
- 3) Coste, en relación a la instrumentación usada y al consumo de reactivos.

Control de la calidad de alimentos (Parte II)

Los sistemas supramoleculares usados en los métodos desarrollados para la monitorización de contaminantes orgánicos en alimentos han sido disolventes constituidos por micelas inversas de ácido decanoico, tetrahidrofurano y pequeñas cantidades de agua sintetizados mediante un proceso de coacervación.

Estos disolventes supramoleculares solubilizan a los analitos mediante diferentes tipos de interacciones (hidrofóbicas y formación de puentes de hidrógeno) y posee una elevada concentración de biotensioactivo ($0,76 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$) y por lo tanto, un elevado número de centros de solubilización, características de especial interés en el diseño de esquemas de microextracción. En esta Tesis Doctoral se ha demostrado, por primera vez, la capacidad de estos disolventes para extraer compuestos orgánicos mediante la adición directa de un pequeño volumen de disolvente (0,4-1,0 mL) a muestras sólidas (200-300 mg).

En el caso de que el método de detección utilizado así lo requiera, es posible llevar a cabo la derivatización de los analitos directamente en el extracto de muestra obtenida usando microextracción supramolecular (MESU).

La técnica MESU se ha usado para desarrollar métodos para la extracción de residuos de drogas de uso veterinario (antibióticos del grupo de las quinolonas y de las sulfonamidas) en productos cárnicos y de piscifactoría previa a su determinación cromatográfica, que aventajan a los que utilizan disolventes orgánicos en:

- 1) Eficacia de extracción. Las recuperaciones obtenidas son cuantitativas para todos analitos independientemente de la composición de la matriz de la muestra.

- 2) Simplicidad. Las extracciones se llevan a cabo en una única etapa y no se requieren etapas de limpieza ni de concentración de los extractos obtenidos.
- 3) Frecuencia de muestreo. La extracción de los analitos se realiza en tiempos comprendidos entre 30 y 40 minutos y, dada la simplicidad del procedimiento analítico utilizado, es posible tratar varias muestras simultáneamente.
- 4) Volumen de disolvente orgánico usado en la extracción. Este se reduce drásticamente respecto al usado en los métodos de tratamiento de muestras convencionales. Sólo se requieren entre 0,2 y 0,5 mL de tetrahidrofurano por muestra tratada.

Monitorización de la contaminación ambiental (Parte III).

Los sistemas supramoleculares usados en el ámbito del análisis ambiental han sido adsorbentes constituidos por hemimicelas de dodecilsulfato sódico (SDS) formadas sobre alúmina.

Se ha demostrado que estos adsorbentes supramoleculares retienen a drogas con carácter anfifílico como ibuprofeno y naproxeno mediante la formación de agregados mixtos. La fuerte interacción que se establece entre droga y tensioactivo en estos agregados proporciona una elevada eficacia de retención, lo que permite alcanzar elevados volúmenes de ruptura (0,75 L) para la extracción en fase sólida de los analitos en muestras acuosas medioambientales muy contaminadas (aguas residuales).

La elución de los analitos se realiza mediante un cambio de pH que produce la desorción del tensioactivo de la alúmina, requiriéndose un pequeño volumen de eluyente (2 mL de NaOH 0,3 M:metanol, 70:30, v/v). Esta es una característica diferencial de los adsorbentes supramoleculares respecto a otros adsorbentes con elevada capacidad de retención como adsorbentes poliméricos, que requieren el uso de un elevado volumen de disolvente para llevar a cabo la elución de los analitos.

Por lo tanto, la extracción en fase sólida supramolecular permite obtener elevados factores de preconcentración sin necesidad de realizar etapas de concentración de los analitos mediante evaporación de disolvente, generalmente requeridas cuando se utilizan otros adsorbentes, simplificando el proceso de extracción.

Finalmente, el volumen de disolventes orgánicos tóxicos utilizados se disminuye significativamente (0,6 mL por muestra) y se evitan las emisiones de estos disolventes a la atmósfera.



APÉNDICES

APÉNDICE A. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL

1.- "Quantitation of fusidane antibiotics in pharmaceuticals using the surfactant-dye binding degree method".

Esther M^a Costi, María Dolores Sicilia, Soledad Rubio, Dolores Pérez-Bendito.

Analytica Chimica Acta, **2005**, 549, 159-165.

2.- "Determination of cationic surfactants in pharmaceuticals based on competitive aggregation in ternary amphiphile mixtures".

Esther María Costi, María Dolores Sicilia, Soledad Rubio, Dolores Pérez-Bendito.

Analytica Chimica Acta, **2006**, 577, 257-263.

3.- "Supramolecular solid-phase extraction of ibuprofen and naproxen from sewage based on the formation of mixed supramolecular aggregates prior to their liquid chromatographic/photometric determination".

Esther María Costi, Irina Goryacheva, María Dolores Sicilia, Soledad Rubio, Dolores Pérez-Bendito.

Journal of Chromatography A, **2008**, 1210, 1-7.

4.- "Supramolecular solvents in solid sample microextractions: Application to the determination of residues of oxolinic acid and flumequine in fish and shellfish".

Esther María Costi, María Dolores Sicilia, Soledad Rubio.

Journal of Chromatography A, **2009**, 1217, 1447-1454.

5.- "Multiresidue analysis of sulfonamides in meat by supramolecular solvent microextraction, liquid chromatography and fluorescence detection and method validation according to the European Union 2002/657/EC directive".

Esther María Costi, María Dolores Sicilia, Soledad Rubio.

Enviado para su publicación al Journal of Chromatography A.

APÉNDICE B. COMUNICACIONES A CONGRESOS

1.- “Quantitation of cationic surfactants based on cresyl violet-SDS binding degree measurements”. **Póster.**

Esther María Costi, María Dolores Sicilia, Soledad Rubio, Dolores Pérez-Bendito.
19TH Conference of the European Colloid and Interface Society; Septiembre de 2005, Geilo (Noruega).

2.- “Determination of therapeutic drugs based on competitive self-assembly in amphiphilic systems”. **Póster.**

Esther María Costi, María Dolores Sicilia, Soledad Rubio, Dolores Pérez-Bendito.
19TH Conference of the European Colloid and Interface Society; Septiembre de 2005, Geilo (Noruega).

3.- “Extracción hemimicelar de drogas terapéuticas de aguas residuales urbanas previa a su determinación mediante cromatografía líquida con detección fotométrica”. **Póster.**

Esther María Costi, Irina Goryacheva, María Dolores Sicilia, Soledad Rubio, Dolores Pérez-Bendito.
XXI Reunión Nacional de Espectroscopía. V Congreso Ibérico de Espectroscopía; Septiembre de 2008, Murcia (España).

4.- “A decanoic acid reverse micelle-based solvent for the microextraction of quinolone antibiotic residues from aquaculture fishes and seafood”. **Póster.**

Esther María Costi, María Dolores Sicilia, Soledad Rubio.
4TH Internacional Symposium on Recent Advances in Food Analysis; Noviembre de 2009, Praga (República Checa).

5.- “Supramolecular solvent-based microextraction of sulphonamide antibiotic residues from meat prior to their determination by liquid chromatography/fluorescence detection”. **Póster.**

Esther María Costi, María Dolores Sicilia, Soledad Rubio.
4TH Internacional Symposium on Recent Advances in Food Analysis; Noviembre de 2009, Praga (República Checa).

6.- “Nanostructured liquids based on decanoic acid reverse micelles for the microextraction of quinolone antibiotic residues from aquaculture fishes and seafood”. **Póster.**

Esther María Costi, María Dolores Sicilia, Soledad Rubio.
II Encuentro sobre nanociencia y nanotecnología de investigadores y tecnólogos de la Universidad de Córdoba; Enero de 2010, Córdoba (España).

7.- “Microextraction of sulphonamide antibiotic residues in meat using supramolecular solvents”. **Póster**.

Esther María Costi, María Dolores Sicilia, Soledad Rubio.

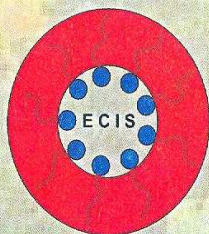
II Encuentro sobre nanociencia y nanotecnología de investigadores y tecnólogos de la Universidad de Córdoba; Enero de 2010, Córdoba (España).

8.- “Microextracción con disolventes supramoleculares de residuos de fármacos en alimentos”. **Oral**.

Esther María Costi.

I Congreso Científico de Investigadores en Formación; Octubre de 2009, Córdoba (España).

**Group of Macromolecular and Colloid Chemistry
The Norwegian Chemical Society
and University of Oslo**



19th Conference of the European Colloid and Interface Society



**September 18 - 23, 2005
Geilo, Norway**

Book of Abstracts

P7.1

Quantitation of cationic surfactants based on cresyl violet-SDS binding degree measurements

E.M. Costi, D. Sicilia, S. Rubio and D. Pérez-Bendito

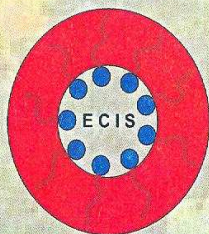
Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Córdoba. Edificio Marie Curie. Campus de Rabanales, 14071-Córdoba, Spain

Dye-surfactant binding degree measurements have been previously used by our research group for the determination of anionic amphiphilic compounds [1, 2]. The anionic dye Coomassie Brilliant Blue G was used as inductor of didodecyldimethylammonium bromide aggregates and as a photometric probe. In this work, the surfactant to dye-binding degree (SDBD) method is used, for the first time, for the determination of cationic amphiphilic compounds. The anionic surfactant sodium dodecylsulfate (SDS) is known to interact with the cationic dye cresyl violet at concentrations far below its critical micelle concentration (cmc), which results in changes in the spectral features of the dye [3]. Cresyl violet induces the formation of SDS premicellar aggregates into which anionic monomers are gradually incorporated as the surfactant concentration increases. Cationic surfactants added to cresyl violet-SDS aqueous mixtures cause a decrease in the degree of binding of surfactant to dye molecules as a result of the interaction between surfactants bearing charge of opposite sign. Based on the effect of cationic surfactants on the cresyl violet-SDS binding degree, an analytical approach for the determination of alkylammonium surfactant is proposed. Cationic surfactants tested were those used as antiseptic drugs in pharmaceutical preparation: alkyltrimethylammonium (cetrimida and cetrimonium), alkylbenzyltrimethylammonium (benzododecinium, cetalkonium and benzalkonium), cetilpiridinium, benzethonium and methyl benzethonium chlorides. Based on the mathematical expression previously derived for the determination of anionic amphiphiles, linear calibration curves in the concentration range 0.5-100 mg l⁻¹ were obtained for all the cationic surfactants assayed. Advantageous analytical features of the SDBD method for the determination of cationic surfactants included: 1) Selectivity toward other active drugs and excipients present in commercial formulations. This permitted most of pharmaceutical samples be directly analyzed; thus, no sample treatment was required for liquid formulations, and only dissolution of solid samples (creams and powders) in water or ethanol prior to their analysis using the SDBD method was performed. 2) Precision; relative standard deviations between 1.0 and 1.5% (n=6) were obtained for the whole analytical process including sample treatment. 3) Ruggedness; the analytical response was kept constant for a wide range of experimental conditions (i.e. pH values between 2 and 9). 3) Rapidity; because of the minimum sample treatment required and the speed of the determination step. 4) Simplicity; only the mixing of a dye and two surfactants to form mixed premicellar aggregates is required. 5) Low cost in both instrumentation (photometric titrator) and reagents.

1. R. Fabios, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 6011
2. A. Pedraza, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta.*, 522 (2004) 89
3. V. B. Gawandi, S.N. Guha, K.I. Priyadarsini and H. Mohan, *J. Colloid Interface Sci.*, 242 (2001) 220

qa1sicrm@uco.es

**Group of Macromolecular and Colloid Chemistry
The Norwegian Chemical Society
and University of Oslo**



19th Conference of the European Colloid and Interface Society



**September 18 - 23, 2005
Geilo, Norway**

Book of Abstracts

P7.6

Determination of therapeutic drugs based on competitive self-assembly in amphiphilic systems

E.m. Costi, D. Sicilia, S. Rubio, and D. Pérez-Bendito

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Córdoba. Edificio Marie Curie. Campus de Rabanales, 14071-Córdoba, Spain

Competition between amphiphilic dyes and drugs to interact with surfactant molecules to form mixed dye-surfactant and drug-surfactant aggregates, constitutes the basis of the determination of therapeutic drugs using the analytical approach termed surfactant to dye binding degree (SDBD) method. The SDBD method was initially developed by our research to quantify the total concentration of ionic surfactants in environmental samples [1]. Recently, this new methodology was extended to the determination of phenamic acids, amphiphilic drugs with molecular structure very different to that of classical surfactants [2]. With the aim of progressing in our knowledge on the use of competitive self-assembly as an analytical tool, in this work, we explore the possibility of determining fusidane antibiotics [fusidic acid (FA) and its sodium salt, sodium fusidate (SF)] by using the SDBD method. These antibacterial agents, as most of drugs used as active ingredients in pharmaceutical preparations, are amphiphilic compounds, but they have unique structural features including a tetracyclic ring system with an unusual chair-boat-chair conformation and a carboxylic acid bearing side chain attached by a double bond. The determination of fusidane antibiotics was based on their effect on the degree of binding of the cationic surfactant didodecyldimethylammonium bromide (DDABr) to the anionic dye Coomassie Brilliant Blue G (CBBG). The formation of mixed DDABr-CBBG aggregates was monitored from changes in the spectral features of the dye. Fusidane antibiotics (FA or SF) added to DDABr-CBBG aqueous mixtures caused a decrease in the surfactant-dye binding degree as a result of the formation of DDABr-drug aggregates. At the working pH (7.0), FA and SF were as fusidate anion; therefore, both hydrophobic and attractive electrostatic interactions were responsible for the formation of these mixed surfactant-drug aggregates. The formation of DDABr-fusidate aggregates with well-defined stoichiometries (between 1:2 and 4:1) was confirmed from turbidimetric studies. The SDBD method permitted the determination of fusidane antibiotics at the mg L⁻¹ level, providing linear calibrations based on the mathematical expression previously derived for determining surfactants. The proposed method was used to quantify FA and SF in pharmaceutical preparations (tablets, pomades and creams). This new competitive self-assembly-based methodology offered important advantages over conventional method used for fusidane antibiotic quality control in terms of sensitivity (detection limit = 0.6 mg L⁻¹), selectivity, which permitted a minimum sample treatment (only dissolution of dosage forms), precision [relative standard deviations for the whole analytical process = 1.5 - 2.0 % (n=6)], rapidity, because of the speed of both sample treatment and determination step, simple instrumentation, only a photometric titrator was required, and low cost.

1. R. Fabios, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 6011
2. A. Pedraza, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta.*, 522 (2004) 89

qa1sirm@uco.es

XXI Reunión Nacional
de Espectroscopia
V Congreso Ibérico
de Espectroscopia

Libro de resúmenes



Murcia, 9-11 de
Septiembre de 2008

Extracción hemimicelar de drogas terapéuticas de aguas residuales urbanas previa a su determinación mediante cromatografía líquida con detección fotométrica

*E. M. Costi, I. Goryacheva, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito
Dep. Química Analítica. Univ. Córdoba. www.uco.es/investiga/grupos/FQM-186*

Los adsorbentes supramoleculares (hemimicelas y admicelas) constituyen una novedosa y útil herramienta para la extracción en fase sólida (SPE) de contaminantes orgánicos de muestras acuosas [1, 2]. Estos adsorbentes consisten en agregados moleculares de tensioactivos iónicos adsorbidos sobre óxidos minerales.

En este trabajo se ha evaluado el uso de adsorbentes supramoleculares para la extracción/preconcentración de drogas terapéuticas de aguas residuales urbanas. Dado el carácter anfifílico (región hidrófoba e hidrófila en su estructura molecular) de la mayoría de las drogas, éstas pueden ser retenidas en adsorbentes supramoleculares mediante formación de agregados mixtos tensioactivo-droga. Las drogas seleccionadas para este estudio fueron ibuprofeno y naproxeno, contaminantes emergentes frecuentemente encontrados en muestras medioambientales debido a su elevado consumo, el elevado porcentaje en el que se excretan sin metabolizar y la baja capacidad de las plantas de tratamiento de aguas residuales para eliminarlos eficazmente. La determinación de estas drogas en muestras acuosas medioambientales necesariamente implica el uso de técnicas de extracción que permitan preconcentrar la muestra y eliminar sustancias interferentes, ya que las concentraciones a las que se encuentran los analitos en este tipo de muestras son muy bajas (del orden de los ng/L a pocos µg/L) y se trata de matrices muy complejas.

Los analitos se retienen cuantitativamente en hemimicelas de dodecilsulfato sódico (SDS)-alúmina. El volumen de muestra no afectó a la capacidad de las hemimicelas para retener naproxeno en todo el intervalo estudiado (0.025-1 L), mientras que el volumen de rotura obtenido para ibuprofeno fue de 750 mL. El consumo de disolvente orgánico disminuye considerablemente respecto al SPE convencional, ya que no se realiza acondicionamiento de la columna de extracción con disolventes orgánicos y la elución se realiza usando 2 mL de NaOH 0.3 M:metanol 70:30 v/v. El método propuesto basado en extracción hemimicelar, cromatografía líquida y detección fotométrica proporciona límites de detección en aguas residuales en los intervalos 7-9 ng/L y 0,5-0,8 ng/l para ibuprofeno y naproxeno, respectivamente. La aplicabilidad de la metodología propuesta a la resolución de problemas analíticos reales se demostró analizando muestras de influentes y efluentes de tres depuradoras andaluzas sin fortificar y fortificadas con 0,4 y 2 µg/L de cada uno de los analitos. Las dos drogas se detectaron en todas las muestras a concentraciones en los intervalos 0,4-7,4 µg/L y 0,2-3,3 µg/L para ibuprofeno y naproxeno, respectivamente y las recuperaciones fueron cuantitativas para todas las muestras analizadas (93-98%), independientemente del grado de contaminación de las mismas.

[1] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6799.

[2] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 76 (2004) 3878.

BOOK OF ABSTRACTS

4th International Symposium on **RECENT ADVANCES IN FOOD ANALYSIS**

November 4–6, 2009
Prague, Czech Republic



F-8

A DECANOIC ACID REVERSE MICELLE-BASED SOLVENT FOR THE MICROEXTRACTION OF QUINOLONE ANTIBIOTIC RESIDUES FROM AQUACULTURE FISHES AND SEAFOOD**Soledad Rubio^{1*}, María Dolores Sicilia², Esther María Costi³**^{1 2 3} University of Córdoba, Córdoba, Spain

* Corresponding author–E-mail: qa1rubrs@uco.es; Phone: 34-957-218644; Fax: 34-957-218644

Decanoic acid (DeA) reverse micelle-based solvents have emerged in the last few years as a valuable alternative for the extraction of organic compounds prior to their chromatographic determination [1]. The most noticeable characteristics of these supramolecular solvents include: capability to solubilise compounds through different interaction mechanisms, high number of solubilisation sites, low cost and experimental convenience.

This article deals with the evaluation of DeA reverse micelle-based solvents for the extraction of oxolinic acid (OXO) and flumequine (FLU) from aquaculture products. Residues of these acidic quinolone antibiotics (AQAs) are frequently found in farming fishes and seafood because of their wide use as effective and low-costly antimicrobial agents. The current maximum residue levels (MRLs) of OXO and FLU permitted by the European Union in edible animal tissues are 100 µg Kg⁻¹ and 600 µg Kg⁻¹, respectively. Reported methods for the determination of AQAs in edible animal tissues usually involve laborious and time-consuming sample treatments including extractions in organic solvents and one or more clean-up steps.

The supramolecular solvent used for extractions in this work was synthesized by dissolving DeA in THF and adding water as coacervating agent (95% v/v). DeA form reverse micelles in THF, which grow in the presence of water owing to their partial desolvation. The larger aggregates formed are insoluble in the water:THF solution and separate from it as an immiscible liquid (the supramolecular solvent). The procedure used for the extraction of AQAs from aquaculture products was as follows: 400 µL of the supramolecular solvent synthesized were added to about 200 mg of chopped sample. Then, the mixture was vortex-shaken and centrifuged. Analytes were determined in the supramolecular extract by liquid chromatography/fluorescence detection.

The proposed supramolecular solvent-based microextraction (SUSME) approach surpasses to those using organic solvent in: 1) Efficiency; recoveries achieved are quantitative and independent on the composition of sample matrices. They ranged between 99–102% with relative standard deviations in the interval 0.2–5% for salmon, sea trout, sea bass, gilt-head bream and prawn samples fortified at analyte concentrations equal and below the corresponding EU MRLs. 2) Simplicity; neither clean-up or solvent evaporation is required. 3) Rapidity; the sample treatment spend about 30 min. 4) environmental friendliness; the consumption of organic solvents is significantly reduced and their emission to the atmosphere avoided.

[1] F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Anal. Chem. 79 (2007) 7473.

Keywords: microextraction, supramolecular solvent, quinolones, fishes

The authors gratefully acknowledge financial support from MEC (Project no. CTQ 2008-01068). E. M. Costi acknowledges the Andalusian CICYE for a postgraduate fellowship.

BOOK OF ABSTRACTS

4th International Symposium on **RECENT ADVANCES IN FOOD ANALYSIS**

November 4–6, 2009
Prague, Czech Republic



F-9

SUPRAMOLECULAR SOLVENT-BASED MICROEXTRACTION OF SULPHONAMIDE ANTIBIOTIC RESIDUES FROM MEAT PRIOR TO THEIR DETERMINATION BY LIQUID CHROMATOGRAPHY/FLUORESCENCE DETECTION**Soledad Rubio^{1*}, María Dolores Sicilia², Esther María Costi³**^{1 2 3} University of Córdoba, Córdoba, Spain

* Corresponding author–E-mail: qa1rubrs@uco.es; Phone: 34-957-218644; Fax: 34-957-218644

Quantifying sulphonamide antibiotic (SA) residues in meat is a difficult task owing to the complexity of the samples, the polarity of the analytes and the low concentrations at which they should be determined (below 0.1 mg kg^{-1} , the maximum residue limit permitted for SAs in Europe and the USA). Reported procedures for the extraction of SA residues from edible animal tissues are lengthy, involve numerous reextraction and cleanup steps, consume large amounts of toxic solvents and/or need the use of equipments not usually available in laboratories. Besides, recoveries obtained frequently are low and/or dependent on the food matrix composition. The quantification of SAs in the extracts is frequently performed by liquid chromatography (LC) with fluorescence (FL) detection after analyte derivatization. Reported LC/mass spectrometry-based methods also provide the sensitivity required for the determination of SA residues in meat but matrix-matched external calibration is required in order to avoid interferences due to matrix components.

This research deals with the evaluation of a supramolecular solvent made up of reverse micelles of decanoic acid (DeA) dispersed in a continuous water:tetrahydrofuran (THF) phase for the extraction of eight SAs (sulfadiazine, sulfamerazine, sulfamethoxypyridazine, sulfachloropyridazine, sulfadoxine, sulfamethoxazole, sulfadimethoxine and sulfaquinoxaline) from meat samples prior to their determination by LC/FLU. SAs were extracted from 200 mg-samples using 1 mL of DeA reverse micelle-based solvent and directly determined in the extract after derivatization with fluorescamine. SAs were effectively extracted from meat using the optimized supramolecular solvent-based microextraction (SUSME) approach independent on the analyte polarity and the composition of sample matrices. The capability of the DeA reverse micelle-based solvent to extract highly polar analytes [octanol-water partition coefficients ($\log K_{ow}$) of SAs ranged between -0.09 and 1.68] can be explained on the basis of the different mechanisms that it provides for analyte solubilisation, i.e. hydrophobic interactions and hydrogen bonds formation, and the high number of solubilisation sites that in it exists. Quantitation limits for the determination of SAs using the proposed SUSME/LC/FLU method were in the interval $0.02\text{--}0.06 \text{ mg kg}^{-1}$ and the precision, expressed as relative standard deviation ($[SAs] = 0.1 \text{ mg kg}^{-1}$, $n=11$) ranged between 2.7 and 3.9%. Recoveries obtained by applying this approach to the analysis of pork, beef, chicken, turkey and lamb samples fortified at the $\mu\text{g Kg}^{-1}$ were in the interval 98–109%.

Keywords: microextraction, supramolecular solvent, sulphonamides, meat

The authors gratefully acknowledge financial support from MEC (Project no. CTQ 2008-01068). E. M. Costi acknowledges the Andalusian CICYE for a postgraduate fellowship.



Universidad de
Córdoba



Instituto Andaluz
de Química Fina y Nanoquímica



JUNTA DE ANDALUCÍA
Consejería de Innovación,
Ciencia y Empresa



**II ENCUENTRO SOBRE
NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA
DE INVESTIGADORES Y TECNÓLOGOS
DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

Córdoba, 14 de enero de 2010

Nanostructured liquids based on decanoic acid reverse micelles for the microextraction of quinolone antibiotic residues from aquaculture fishes and seafood.

E.M. Costi, M.D. Sicilia and S. Rubio

Departamento de Química Analítica

Universidad de Córdoba

Edificio Anexo Marie Curie

coloe22@hotmail.com y www.uco.es/investiga/grupos/FQM-186

Nanostructured liquids based on decanoic acid reverse micelles have emerged in the last few years as a valuable alternative for the extraction of organic compounds prior to their chromatographic determination¹. The most noticeable characteristics of these nanostructured liquids include: capability to solubilise compounds through different interaction mechanisms, high number of solubilisation sites, low cost and experimental convenience.

This article deals with the evaluation of nanostructured liquids based on decanoic acid reverse micelles for the extraction of oxolinic acid (OXO) and flumequine (FLU) from aquaculture products. Residues of these acidic quinolone antibiotics (AQAs) are frequently found in farming fishes and seafood because of their wide use as effective and low-costly antimicrobial agents. The current maximum residue levels (MRLs) of OXO and FLU permitted by the European Union in edible animal tissues are 100 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ and 600 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, respectively. Reported methods for the determination of AQAs in edible animal tissues usually involve laborious and time-consuming sample treatments including extractions in organic solvents and one or more clean-up steps.

The nanostructured liquid used for extractions in this work was synthesized by dissolving DeA in THF and adding water as coacervating agent (95% v/v). DeA form reverse micelles in THF, which grow in the presence of water owing to their partial desolvation. The larger aggregates formed are insoluble in the water:THF solution and separate from it as an immiscible liquid (the nanostructured liquid). The procedure used for the extraction of AQAs from aquaculture products was as follows: 400 μL of the nanostructured liquid synthesized were added to about 200 mg of chopped sample. Then, the mixture was vortex-shaken and centrifuged. Analytes were determined in the nanostructured extract by liquid chromatography/fluorescence detection.

The proposed nanostructured liquid-based microextraction approach surpasses to those using organic solvent in: 1) Efficiency; recoveries achieved are quantitative and independent on the composition of sample matrices. They ranged between 99-102% with relative standard deviations in the interval 0.2-5% for salmon, sea trout, sea bass, gilt-head bream and prawn samples fortified at analyte concentrations equal and below the corresponding EU MRLs. 2) Simplicity; neither clean-up or solvent evaporation is required. 3) Rapidity; the sample treatment spend about 30 min. 4) environmental friendliness; the consumption of organic solvents is significantly reduced and their emission to the atmosphere avoided.

¹ Ruiz, F.J., Rubio S., Pérez-Bendito D., *Anal. Chem.*, **2007**, *79*, 7473



Universidad de
Córdoba



Instituto Andaluz
de Química Fina y Nanoquímica



JUNTA DE ANDALUCÍA
Consejería de Innovación,
Ciencia y Empresa



**II ENCUENTRO SOBRE
NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA
DE INVESTIGADORES Y TECNÓLOGOS
DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

Córdoba, 14 de enero de 2010

Microextraction of sulphonamide antibiotic residues in meat using supramolecular solvents**E.M. Costi, M.D. Sicilia and S. Rubio***Departamento de Química Analítica**Universidad de Córdoba**Edificio Anexo Marie Curie**coloe22@hotmail.com y www.uco.es/investiga/grupos/FQM-186*

Quantifying sulphonamide antibiotic (SA) residues in meat is a difficult task owing to the complexity of the samples, the polarity of the analytes and the low concentrations at which they should be determined (below 0.1 mg Kg^{-1} , the maximum residue limit permitted for SAs in Europe and the USA). Reported procedures for the extraction of SA residues from edible animal tissues are lengthy, involve numerous reextraction and cleanup steps, consume large amounts of toxic solvents and/or need the use of equipments not usually available in laboratories. Besides, recoveries obtained frequently are low and/or dependent on the food matrix composition. The quantification of SAs in the extracts is frequently performed by liquid chromatography (LC) with fluorescence (FL) detection after analyte derivatization. Reported LC/mass spectrometry-based methods also provide the sensitivity required for the determination of SA residues in meat but matrix-matched external calibration is required in order to avoid interferences due to matrix components.

This research deals with the evaluation of a supramolecular solvent made up of reverse micelles of decanoic acid (DeA) dispersed in a continuous water:tetrahydrofuran (THF) phase for the extraction of eight SAs (sulfadiazine, sulfamerazine, sulfamethoxypyridazine, sulfachloropyridazine, sulfadoxine, sulfamethoxazole, sulfadimethoxine and sulfaquinoxaline) from meat samples prior to their determination by LC/FLU. SAs were extracted from 200 mg-samples using 1 mL of supramolecular solvent and directly determined in the extract after derivatization with fluorescamine. SAs were effectively extracted from meat using the optimized supramolecular solvent-based microextraction (SUSME) approach independent on the analyte polarity and the composition of sample matrices. The capability of the DeA reverse micelle-based solvent to extract highly polar analytes [octanol-water partition coefficients ($\log K_{ow}$) of SAs ranged between -0.09 and 1.68] can be explained on the basis of the different mechanisms that it provides for analyte solubilisation, i.e. hydrophobic interactions and hydrogen bonds formation, and the high number of solubilisation sites that in it exists. Quantitation limits for the determination of SAs using the proposed SUSME/LC/FLU method were in the interval $0.02\text{-}0.06 \text{ mg Kg}^{-1}$ and the precision, expressed as relative standard deviation ($[SAs] = 0.1 \text{ mg Kg}^{-1}$, $n = 11$) ranged between 2.7 and 3.9%. Recoveries obtained by applying this approach to the analysis of pork, beef, chicken, turkey and lamb samples fortified at the $\mu\text{g Kg}^{-1}$ were in the interval 98-109%.



Los Vicerrectores de Estudios de Postgrado y Formación Continua y Política Científica acreditan que D/D^a ESTHER MARÍA COSTI LÓPEZ ha presentado la comunicación titulada **MICROEXTRACCIÓN CON DISOLVENTES SUPRAMOLECULARES DE RESIDUOS DE FÁRMACOS EN ALIMENTOS**, en el *I Congreso Científico de Investigadores en Formación* celebrado en Córdoba los días 15 y 16 de octubre de 2009.

VICERRECTOR DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
Y FORMACIÓN CONTINUA

FDO: José Carlos GÓMEZ VILLAMANDOS

VICERRECTOR DE
POLÍTICA CIENTÍFICA

FDO: Enrique AGUILAR BENÍTEZ DE LUGO

TÍTULO: MICROEXTRACCIÓN CON DISOLVENTES SUPRAMOLECULARES DE RESIDUOS DE FÁRMACOS EN ALIMENTOS

OBJETIVOS

En la producción de animales de consumo humano se utiliza una gran variedad de fármacos con fines terapéuticos, profilácticos o como promotores del crecimiento. Por lo tanto, los alimentos de origen animal pueden contener residuos de estos fármacos que pueden perjudicar seriamente la salud de los consumidores. En los países de la Unión Europea, incluida España, se ha establecido la concentración máxima permitida para cada residuo de fármaco en cada alimento, siendo necesarios controles rutinarios para comprobar que se cumplen los límites establecidos en la legislación. La determinación de residuos de fármacos en alimentos necesariamente implica la extracción del residuo previa a su determinación. Los métodos de extracción disponibles requieren el uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos tóxicos e inflamables y son muy laboriosos, implicando extracciones repetitivas y etapas de limpieza y evaporación del disolvente. El objetivo de los trabajos de investigación realizados en esta Tesis Doctoral en este ámbito ha sido desarrollar nuevos métodos de extracción de residuos de fármacos de uso veterinario en alimentos basados en el uso de disolventes supramoleculares, que aventajen a los métodos de extracción basados en el uso de disolventes orgánicos en simplicidad, rapidez, seguridad y respeto al medio ambiente. Los disolventes supramoleculares usados están constituidos por micelas inversas de ácido decanoico en tetrahidrofurano-agua. Los analitos seleccionados para el estudio han sido antibióticos de uso veterinario, por su importante repercusión en el desarrollo de microorganismos resistentes.

MÉTODO DE TRABAJO

La metodología usada para alcanzar los objetivos previstos ha sido la siguiente:

1. Selección de antibióticos ampliamente usados en el tratamiento de animales en explotaciones ganaderas y piscifactorías, de las matrices de interés y de las técnicas de determinación más adecuadas.
2. Estudio de las variables experimentales que influyen en el rendimiento del proceso de microextracción: volumen y composición del disolvente supramolecular, pH, tiempo de agitación y tiempo de centrifugación.

3. Estudio de las variables experimentales que afectan al rendimiento de las reacciones de derivatización de los analitos en el extracto supramolecular, en caso de ser necesarias, previas a la determinación de éstos mediante cromatografía líquida con detección fluorimétrica: concentración de reactivo derivatizador, tiempo de reacción, etc.
4. Evaluación de los parámetros de calidad de los métodos desarrollados: exactitud, precisión, selectividad, sensibilidad y límites de detección y cuantificación
5. Validación de las metodologías propuestas con el uso de materiales de referencia certificados o muestras fortificadas en su defecto.
6. Aplicación de los métodos desarrollados al análisis de muestras reales.

APORTACIONES PREVISTAS DE LA TESIS:

En esta Tesis doctoral se propone por primera vez el uso de disolventes supramoleculares para la microextracción directa de compuestos orgánicos de muestras sólidas. Hasta la realización de los trabajos de investigación que aquí se presentan, las extracciones se llevaban a cabo usando el disolvente supramolecular disperso en una disolución acuosa. Sin embargo, este procedimiento no es adecuado para la extracción de compuestos polares, ya que la elevada solubilidad de estos analitos en la fase acuosa afecta negativamente a su extracción en la fase supramolecular. Realizando la extracción directa de los analitos en el disolvente supramolecular se mejoran en gran medida los rendimientos de extracción de analitos polares y se posibilita la miniaturización del tratamiento de muestra. La cantidad de muestra tratada es del orden de miligramos y el volumen de disolvente supramolecular usado en la extracción es del orden de microlitros. Además, las extracciones se llevan a cabo en una única etapa y, dado el pequeño volumen de disolvente supramolecular usado, no se precisa la evaporación del disolvente para concentrar los analitos. La capacidad de la técnica de microextracción directa con el uso de disolventes supramoleculares para la extracción eficaz de analitos polares en muestras sólidas complejas se ha demostrado mediante el desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de quinolonas en peces de piscifactoría y de sulfonamidas en carnes. A continuación se exponen los aspectos más destacados de cada una de las metodologías desarrolladas.

Determinación de quinolonas en productos de piscifactoría. El método desarrollado permite la extracción cuantitativa de los antibióticos ácido oxolínico y flumequina de muestras de pescado y la determinación directa de los analitos en el extracto mediante cromatografía líquida con detección fluorimétrica, evitando etapas de eliminación de interferencias, habituales en los métodos propuestos hasta la fecha. Además, el método presenta otras ventajas entre las que cabe destacar su rapidez, el tiempo total de extracción es de 30 min y es posible tratar 10 muestras simultáneamente, y una drástica reducción de la cantidad de disolventes orgánicos utilizados (30-110 veces). Los límites de cuantificación obtenidos con el método propuesto para la determinación de ácido oxolínico y flumequina (22 y 15 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, respectivamente) son muy inferiores a los límites máximos permitidos por la legislación española y europea para estos analitos en productos de consumo (100 y 600 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, respectivamente). Esto, junto con su rapidez, simplicidad y bajo coste, lo hacen especialmente adecuado para el control rutinario de la calidad de productos piscícolas. El método desarrollado se validó mediante el análisis de un material de referencia certificado (BCR-725) y se aplicó al análisis de diferentes tipos de muestras (salmón, trucha, gallo, dorada, lubina y langostinos).

Determinación de sulfonamidas en productos cárnicos. Se ha desarrollado un método para la determinación de ocho sulfonamidas (sulfadiazina, sulfamerazina, sulfametoxipiridazina, sulfaclopiridazina, sulfadoxina, sulfametoxazol, sulfadimetoxina y sulfaquinoxalina) en carnes destinadas al consumo humano. Las sulfonamidas se extraen en el disolvente supramolecular donde son derivatizadas mediante reacción con fluorescamina y posteriormente determinadas mediante cromatografía líquida con detección fluorimétrica. Los límites de detección obtenidos para la determinación de las ocho sulfonamidas ensayadas son, en todos los casos, inferiores al límite máximo permitido por la legislación española y europea para estos antibióticos en carnes (100 $\mu\text{g Kg}^{-1}$). La validez del método desarrollado para el análisis de muestras reales se demostró mediante estudios de recuperación a partir de muestras de carne de cerdo, pollo, pavo, ternera y cordero fortificadas, obteniéndose recuperaciones entre el 98 y el 109% para todas las drogas ensayadas.

